

THAÍS LINDENBERG ROCHA SILVA

**NOVO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO EM BAIXA  
TEMPERATURA, EM ETAPA ÚNICA, PARA  
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM  
SORO SANGUÍNEO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586n  
2017  
Silva, Thaís Lindenberg Rocha, 1991-  
Novo método de microextração em baixa temperatura, em  
etapa única, para determinação de resíduos de agrotóxicos em  
soro sanguíneo / Thaís Lindenberg Rocha Silva. – Viçosa, MG,  
2017.

xvii,77f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.67-77.

1. Cromatografia a gás. 2. Produtos químicos agrícolas.  
3. Pesticidas - Aspectos ambientais. 4. Extração (Química).  
5. Soro. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Química. Programa de Pós-graduação em Agroquímica.  
II. Título.

CDD 22 ed. 543.85

THAÍS LINDENBERG ROCHA SILVA

**NOVO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO EM BAIXA  
TEMPERATURA, EM ETAPA ÚNICA, PARA  
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM  
SORO SANGUÍNEO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 21 de fevereiro de 2017

---

Patrícia Aparecida Fontes Vieira

---

José Humberto de Queiroz

---

André Fernando de Oliveira  
(Coorientador)

---

Antônio Augusto Neves  
(Coorientador)

---

Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz  
(Orientadora)

Dedico este trabalho a *Deus e Nossa Senhora;*  
*Aos meus pais Dilseberg e Angela e ao meu irmão Lusemberg.*

*Com muito amor agradeço pelo apoio em todas as  
etapas de minha vida e pelo amor incondicional.*

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz, por sua orientação e grande colaboração em meu processo de aprendizagem, além de sua amizade e companheirismo;

Aos professores Antônio Augusto Neves, André Fernando de Oliveira e Patrícia Aparecida Fontes pelos ensinamentos, a dedicação e a amizade;

Ao Breno Cesar Vieira pela contribuição ao meu trabalho;

À técnica e amiga Liany (LAQUA) pela disponibilidade e grande ajuda;

Ao professor José Humberto de Queiroz pela participação na defesa desta dissertação;

À professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, do departamento de Bioquímica, pela doação das amostras de soro sanguíneo humano;

À Universidade Federal de Viçosa, particularmente ao Departamento de Química, pela oportunidade de realizar o curso;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela cessão da bolsa de auxílio financeiro.

## **AGRADECIMENTOS PESSOAIS**

À Deus e à virgem Maria, por estarem presentes em todos os momentos de minha vida me dando força, sabedoria e coragem para chegar até aqui;

Aos meus pais, Dilseberg e Angela M<sup>a</sup>, pelo amor incondicional, o apoio, a confiança e o incentivo. Amo muito vocês;

Ao meu irmão Lusemberg por ser um grande amigo e companheiro, que sempre me apoiou;

Aos meus avós, tios e primos por todo o incentivo e por estarem presentes em toda a caminhada, especialmente aos meus tios Amarilis, Avani, Alzenir, Ana marilza, Aroldo e Clara e aos meus primos Renato e Geraldo;

A todos os amigos do LAQUA: Alessandra, Ariany, Ana Cecília, Carol, Cris, Fernanda, Jessika, Laurence, Liany, Luiz Manoel, Luiza, Luisa, Malu, Marcos, Mariane, Nelson, Raquel, Rafael e Thais que me incentivaram e me ajudaram a realizar esse sonho.

Aos meus amigos, Mayara Dutra, Keilla, Ana Paula, Maria Luiza, Luiza, Laurence, Raquel, Jessika, Mariane, Kamilla, Sabrina, Rodrigo e Júlio pela amizade e a força nos momentos de desespero;

E a todos os outros que de alguma forma me ajudaram, mesmo que apenas com uma palavra de incentivo.

## **BIOGRAFIA**

THAÍS LINDENBERG ROCHA SILVA, filha de Dilseberg da Silva e Angela Maria da Rocha Silva, nasceu em Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo, em 06 de abril de 1991.

Em março de 2010, iniciou o Curso de Bacharel em Química, pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa - MG, diplomando-se como Bacharel em janeiro de 2015.

Estagiou no Laboratório de Química Analítica (LAQUA) do Departamento de Química, no período de 15 de outubro de 2013 a 04 de dezembro de 2014.

Em março de 2015, iniciou o curso de Pós-Graduação em Agroquímica, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa - UFV, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2017.

# SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT .....	xvi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. Contaminação Humana.....	4
2.1.1. Contaminação Indireta e Direta.....	5
2.2. Agrotóxicos.....	6
2.3. Efeitos na Saúde Humana.....	9
2.4. Matrizes Biológicas.....	10
2.4.1. Sangue.....	11
2.4.2. Soro.....	12
2.5. Técnicas de extração .....	13
2.6. Técnicas de análise química .....	15
3. OBJETIVOS .....	17
3.1. Objetivo geral .....	17
3.2. Objetivos específicos .....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
4.1. Reagentes e Soluções .....	18
4.2. Instrumentação.....	20
4.3. Amostras.....	21
4.5. Extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT)..	22
4.5.1. Otimização da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura .....	23
4.6. Estabilidade dos analitos.....	24
4.7. Validação do método analítico .....	24
4.7.1. Seletividade.....	24
4.7.2. Linearidade da resposta do método .....	24
4.7.3. Limite de detecção e limite de quantificação .....	25

4.7.4. Exatidão .....	25
4.7.5. Precisão .....	26
4.7.5.1. Repetitividade.....	26
4.7.5.2. Precisão intermediária.....	26
4.8. Análise de agrotóxicos em amostras de soro sanguíneo de agricultores..	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1. Análise cromatográfica.....	28
5.2. Otimização da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) .....	30
5.3. Método de microextração em única etapa e análise por cromatografia gasosa.....	38
5.4. Estudo da estabilidade do analito na matriz.....	38
5.5. Validação do método analítico .....	40
5.5.1. Seletividade.....	40
5.5.2. Linearidade de resposta do método .....	43
5.5.3. Limite de detecção e limite de quantificação .....	48
5.5.4. Exatidão .....	49
5.5.5. Precisão .....	50
5.5.5.1. Repetitividade.....	50
5.5.5.2. Precisão intermediária.....	51
5.6. Análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM) .....	52
5.6.1. Comparação entre o soro fetal bovino e soro sanguíneo humano .....	55
5.6.2. Amostras de soro sanguíneo de agricultores da região de Coimbra .....	60
6. CONCLUSÕES .....	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADI – Ingestão Diária Aceitável

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CEP/UFV – Comitê de Ética em Pesquisa da UFV

$C_f$  – Concentração do extrato

CG – Cromatografia Gasosa

CG/DCE – Cromatografia Gasosa com Detector por Captura de Elétrons

CG/EM - Cromatógrafo Gásosa acoplado ao Espectrômetro de Massas

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-MS – Cromatógrafo em Fase Líquida acoplado ao Espectrômetro de Massas

CV – Coeficiente de Variação

dv – Desvio padrão

$\epsilon$  – Constante Dielétrica

ELL – Extração Líquido-Líquido

ELL/PBT – Extração Líquido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura

ESL/PBT – Extração Sólido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura

EPI's – Equipamentos de Proteção Individual

ESL – Extração Sólido-Líquido

FE – Fator de Enriquecimento

HPLC – *Hight-performance Liquid Chromatography*

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

$K_D$  – Coeficiente de Partição

LAQUA – Laboratório de Química Analítica

LD – Limite de Detecção

LD50<sub>agudo</sub> – mede a intoxicação aguda por via oral. Este valor é a metade da dose necessária para que uma substância química provoque a morte

LQ – Limite de Quantificação

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MELLD - Microextração Líquido-Líquido dispersiva

MM – Massa Molar

$R^2$  – Coeficiente de Determinação

%R – Porcentagem de Recuperação

RSD – desvio padrão relativo

r – Coeficiente de Correlação

TIC - Cromatograma de íons totais (TIC - *total ion chromatogram*)

SIM – Monitoramento do íon selecionado (*Select Ion Monitoring*)

SINITOX – Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

SPE – *Solid-Phase extraction* (Extração em Fase Sólida)

SPME – *Solid-Phase Micro-Extraction* (MEFS - Microextração em Fase Sólida)

$t_R$  – Tempo de Retenção

TE – Temperatura de Ebulição.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação dos agrotóxicos segundo o grau de toxicidade .....	7
<b>Tabela 2.</b> Substituintes dos radicais R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> e R <sub>3</sub> na estrutura base dos piretróides.....	9
<b>Tabela 3.</b> Agrotóxicos estudados e suas características físico-químicas.....	19
<b>Tabela 4.</b> Planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> com ponto central (n=2) aplicado na otimização da ELL-PBT de amostras de soro sanguíneo com as três variáveis e os seus códigos.....	23
<b>Tabela 5.</b> Tempo de retenção dos agrotóxicos nas condições cromatográficas e suas respectivas massas molares.....	29
<b>Tabela 6.</b> Fator de enriquecimento que cada experimento do planejamento experimental.....	37
<b>Tabela 7.</b> Equações da reta e coeficientes de determinação do clorpirifós, bifentrina, λ-cialotrina e deltametrina.....	46
<b>Tabela 8.</b> Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método para o clorpirifós, bifentrina, λ-cialotrina e deltametrina.....	48
<b>Tabela 9.</b> Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação (CV) obtidos pela análise de amostras de soro fetal bovino fortificada em três níveis de concentração.....	49
<b>Tabela 10.</b> Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação (CV) obtida, para amostras de soro fetal bovino fortificadas em três níveis de concentração. Sendos estes ensaios intra-dia.....	51
<b>Tabela 11.</b> Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação (CV) obtida, para amostras de soro fetal bovino fortificadas em três níveis de concentração. Sendos estes ensaios intra-dia obtidos após análise em dias diferentes.....	52
<b>Tabela 12.</b> Tempo de retenção dos agrotóxicos nas condições cromatográficas do CG/EM.....	54
<b>Tabela 13.</b> Concentrações dos analitos em amostras de soro sanguíneo humano, determinadas por CG/DCE.....	60

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura química do inseticida Clorpirifós.....	8
<b>Figura 2.</b> Estrutura química base de piretróides sintéticos.....	9
<b>Figura 3.</b> Estrutura química da bifentrina.....	9
<b>Figura 4.</b> Desenho esquemático das diferentes formas em que o sangue pode ser avaliado.....	12
<b>Figura 5.</b> Imagem de sangue humano centrifugado mostrando a separação do soro (parte líquida) e o coágulo.....	12
<b>Figura 6.</b> Cromatograma de uma solução-padrão dos agrotóxicos em acetonitrila nas concentrações de $300 \mu\text{g L}^{-1}$ para o clorpirifós, bifentrina, $\lambda$ -cialotrina e $600 \mu\text{g L}^{-1}$ para a deltametrina, em que (1) $t_R = 4,66$ min: clorpirifós; (2) $t_R = 6,93$ min: bifentrina; (3) $t_R = 7,74$ min: $\lambda$ -cialotrina; (4) $t_R = 10,2$ min: deltametrina.....	28
<b>Figura 7.</b> Correlação entre a massa molar e o tempo de retenção dos quatro agrotóxicos em estudo (clorpirifós, bifentrina, $\lambda$ -cialotrina e deltametrina).....	29
<b>Figura 8.</b> Fotos dos testes preliminares, onde é possível observar a precipitação de proteínas: a) DLLME e b) a ELL/PBT com a precipitação de proteínas por adição de solventes orgânicos na presença e ausência de sais neutros.....	30
<b>Figura 9.</b> Superfície de respostas envolvendo os fatores volume de Água (F1) e o tempo de agitação (F3), de um planejamento fatorial $2^3$ com ponto central (n=2), tendo a concentração como resposta. Sendo: (a) clorpirifós, (b) bifentrina, (c) $\lambda$ -cialotrina e (d) deltametrina.....	32
<b>Figura 10.</b> Superfície de respostas envolvendo os fatores volume de Acetonitrila (F2) e o tempo de agitação (F3), de um planejamento fatorial $2^3$ com ponto central (n=2), tendo a concentração como resposta. Sendo: (a) clorpirifós, (b) bifentrina, (c) $\lambda$ -cialotrina e (d) deltametrina.....	34
<b>Figura 11.</b> Superfície de respostas envolvendo os fatores volume de água (F1) e volume de Acetonitrila (F2), de um planejamento fatorial $2^3$ com ponto central (n=2), tendo a concentração como resposta. Sendo: (a) clorpirifós, (b) bifentrina, (c) $\lambda$ -cialotrina e (d) deltametrina.....	35

<b>Figura 12.</b> Superfície de respostas envolvendo os fatores volume de Água (F1) e o tempo de agitação (F3), de um planejamento fatorial $2^3$ com ponto central (n=2), tendo a concentração como resposta. Sendo: (a) clorpirifós, (b) bifentrina, (c) $\lambda$ -cialotrina e (d) deltametrina.....	36
<b>Figura 13.</b> Estudo de estabilidade dos analitos. a) Comportamento dos analitos na amostra armazenada em geladeira e b) Comportamento dos analitos na amostra armazenada em freezer.....	39
<b>Figura 14.</b> Fotos de amostras de soro fetal bovino, na temperatura ambiente, no 23º dia do estudo de estabilidade da matriz. Sendo que o frasco da esquerda foi armazenado no freezer e o da direita na geladeira.....	40
<b>Figura 15.</b> Cromatograma, obtidos através do CG/DEC, de extrato das amostras de soro bovino fetal a) isenta dos analitos; b) contendo $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de clorpirifós, bifentrina e $\lambda$ -cialotrina e $100 \mu\text{g L}^{-1}$ deltametrina: (1) clorpirifós: $t_R = 4,66 \text{ min}$ ; (2) bifentrina: $t_R = 6,93 \text{ min}$ ; (3) $\lambda$ -cialotrina: $t_R = 7,74 \text{ min}$ e (4) deltametrina: $t_R = 10,2 \text{ min}$ .....	41
<b>Figura 16.</b> Estrutura química do glicerol 2-palmitato.....	42
<b>Figura 17.</b> Cromatograma de extrato das amostras de soro sanguíneo humano a) isenta dos analitos; b) contendo $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de clorpirifós, bifentrina e $\lambda$ -cialotrina e $200 \mu\text{g L}^{-1}$ deltametrina: (1) clorpirifós: $t_R = 4,66 \text{ min}$ ; (2) bifentrina: $t_R = 6,93 \text{ min}$ ; (3) $\lambda$ -cialotrina: $t_R = 7,74 \text{ min}$ e (4) deltametrina: $t_R = 10,2 \text{ min}$ .....	42
<b>Figura 18.</b> Curvas analíticas preparadas a partir de extratos de amostras de soro fetal bovino fortificadas com padrão dos analitos, em uma faixa de concentração de $20$ a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ para clorpirifós, bifentrina e $\lambda$ -cialotrina e de $40$ a $200 \mu\text{g L}^{-1}$ para a deltametrina, submetidas à ELL-PBT. O extrato foi analisado por CG/DCE. Sendo: (a) clorpirifós, (b) bifentrina, (c) $\lambda$ -cialotrina e (d) deltametrina.....	45
<b>Figura 19.</b> Gráficos de resíduos para as curvas analíticas das amostras de soro sanguíneo, em uma faixa de concentração de $20$ a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ para clorpirifós, bifentrina e $\lambda$ -cialotrina e de $40$ a $200 \mu\text{g L}^{-1}$ para a deltametrina, e analisados por CG/DCE. Sendo: (a) clorpirifós, (b) bifentrina, (c) $\lambda$ -cialotrina e (d) deltametrina.....	47
<b>Figura 20.</b> Cromatograma obtido por CG/EM de uma solução padrão de clorpirifós,	

bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina a  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  e deltametrina a  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  em acetonitrila. Sendo: (a) análise no modo TIC. Em que (1)  $t_R = 5,02$  min: clorpirifós; (2)  $t_R = 6,62$  min: bifentrina; (3)  $t_R = 7,20$  min:  $\lambda$ -cialotrina; (4)  $t_R = 10,3$  min: deltametrina (b) Espectros de massas dos agrotóxicos. Sendo: (b1) clorpirifós, (b2) bifentrina, (b3)  $\lambda$ -cialotrina e (b4) deltametrina.....53

**Figura 21.** Cromatogramas obtido por CG/EM no modo SIM de uma solução padrão com  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina e  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  deltametrina em acetonitrila. Em que (1)  $t_R = 5,02$  min: clorpirifós; (2)  $t_R = 6,62$  min: bifentrina; (3)  $t_R = 7,20$  min:  $\lambda$ -cialotrina; (4)  $t_R = 10,3$  min: deltametrina.....55

**Figura 22.** Cromatogramas obtidos no CG/EM para amostras de soro bovino fetal. Sendo: (a) amostra isenta de agrotóxicos no modo TIC, (b) amostra fortificada com  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina e  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  deltametrina no modo TIC e (c) amostra fortificada com  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina e  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  deltametrina no modo SIM.....57

**Figura 23.** Cromatogramas do CG/ME para amostras de soro humano. Sendo: (a) amostra isenta de agrotóxicos no modo TIC, (b) amostra fortificada com  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina e  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  deltametrina no modo TIC e (d) amostra fortificada com  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina e  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  deltametrina no modo SIM.....58

**Figura 24.** Estrutura química do Colesterol.....59

**Figura 25.** Cromatograma do CG/DCE das amostras de soro humano. Sendo: (a) amostra 22 e (b) amostra 26.....62

**Figura 26.** Cromatograma do CG/EM das amostras de soro humano. Sendo: (a) amostra 22 no modo TIC, (b) amostra 22 no modo SIM, (c) amostra 26 no modo TIC, (b) amostra 26 no modo SIM.....63

**Figura 27.** Estrutura química do 5-Etil-5-fenil-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatrional (fenobarbital).....64

## RESUMO

SILVA, Thaís Lindenberg Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Novo método de microextração em baixa temperatura, em etapa única, para a determinação de resíduos de agrotóxicos em soro sanguíneo.** Orientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Coorientadores: André Fernando de Oliveira e Antônio Augusto Neves.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método analítico para determinar a presença dos agrotóxicos: clorpirifós, bifentrina,  $\lambda$ -cialotrina e deltametrina em soro sanguíneo por cromatografia gasosa. O método de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL/PBT) e análise por cromatografia gasosa foi otimizado e validado. Foi utilizado um cromatógrafo a gás com detecção por captura de elétrons (CG/DCE) na otimização e validação do método e um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (CG/EM) para confirmação da presença dos analitos em amostras de sangue de trabalhadores rurais da cidade de Coimbra - MG. Utilizou-se um planejamento fatorial completo com 2 níveis e 3 variáveis ( $2^3$ ) e com ponto central ( $n=2$ ) envolvendo 10 ensaios para otimização do método. Os fatores otimizados para 500  $\mu\text{L}$  de soro sanguíneo foram o volume de água adicionado (1000  $\mu\text{L}$ ), o volume de solvente extrator (500  $\mu\text{L}$  de acetonitrila) e o tempo de agitação (60 s em vórtex). Posteriormente a mistura foi levada ao freezer à  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  por 12 h para separação das fases. O extrato sobrenadante foi removido para análise instrumental. O método foi validado e os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, limite de detecção e quantificação, exatidão e precisão. Além disso, a estabilidade dos analitos nas amostras de soro sanguíneo foi avaliada. Os resultados indicaram que o método de ELL/PBT é eficiente para a extração dos analitos nas amostras de soro sanguíneo (75,3 a 115 %), mostrando-se seletivo e sensível, com limites de detecção e quantificação variando de 2,57 a 5,10  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 8,58 a 17,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Logo, o método de preparo de amostras proposto se mostrou simples, eficaz e de baixo impacto ambiental. A maioria das amostras de soro sanguíneo de trabalhadores rurais analisadas não apresentou traços dos agrotóxicos em estudo. No entanto, em uma das amostras constatou-se a presença de clorpirifós na concentração de 11,4  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Em outra amostra observou-se a presença de um pico no mesmo tempo de retenção do clorpirifós, entretanto, este foi identificado por CG/EM como sendo um medicamento contra epilepsia

(fenobarbital). Este resultado demonstrou como é importante a análise por uma técnica instrumental que permita a confirmação da presença dos analitos, tornando o método ainda mais confiável.

---

## ABSTRACT

SILVA, Thaís Lindenberg Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **New method of microextraction in low temperature, single stage, for the determination of residues of agrochemicals in blood serum.** Adviser: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Co-advisers André Fernando de Oliveira and Antônio Augusto Neves.

The objective of this work was to develop an analytical method to identify and quantify the presence of pesticides chlorpyrifos, bifenthrin,  $\lambda$ -cyhalothrin and deltamethrin in blood serum by gas chromatography. The method of liquid-liquid extraction with low temperature partition (ELL/PBT) and gas chromatography analysis was optimized and validated. A gas chromatograph with electron capture detection (GC/DCE) was used in the optimization and validation of the method and a gas chromatograph coupled to mass spectrometer (GC/MS) was used to confirm the presence of the analytes in blood samples from rural workers from the region of Coimbra - MG. A complete factorial design with 2 levels and 3 variables (2<sup>3</sup>) and center point (n = 2) was used involving 10 trials to optimize the method. The optimized factors for 500  $\mu$ L of blood serum were the volume added of water (1000  $\mu$ L), the volume of extractor solvent (500  $\mu$ L of acetonitrile) and the stirring time (60 s in vortex). Subsequently the mixture was taken to the freezer at -20 °C for 12 h to separate the phases. The supernatant extract was removed for instrumental analysis. The method was validated and the parameters evaluated were selectivity, linearity, limit of detection and quantification, accuracy and precision. In addition, the stability of the analytes in serum samples was studied. The results indicated that the ELL/PBT method is efficient for extraction of analytes into blood serum samples (75.3 to 115%), showing selectivity and sensitivity, with limit of detection and quantification range of 2.57 to 5.10  $\mu$ g L<sup>-1</sup> and 8.58 to 17.0  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, respectively. Therefore, the proposed method was simple, efficient, with low cost and low environmental impact. Most of the blood serum samples from rural workers analyzed did not present traces of the pesticides under study. However, in one the presence of chlorpyrifos in the concentration of 11.4  $\mu$ g L<sup>-1</sup> was verified. In another sample the presence of a peak at the same retention time of chlorpyrifos was observed. It was identified by GC/MS as being a drug against epilepsy (phenobarbital). This result demonstrated how the

---

analysis is imported by an instrumental technique that allows the confirmation of the presence of the analytes, making the method even more reliable.

---

# 1. INTRODUÇÃO

Após a Revolução Verde, na década de 50, o Brasil adotou um sistema de produção agropecuária cujo aumento da produtividade está diretamente relacionado com a mecanização, adubagem, melhoramento genético e o uso de insumos químicos, incluindo os agrotóxicos, que são substâncias capazes de controlar pragas agropecuárias. O intuito inicial deste modelo de produção foi aumentar a produtividade agrícola e assim resolver o problema da fome no pós-guerra (MOREIRA *et al.*, 2002).

O problema do uso de agrotóxico é que quando utilizado de maneira inadequada pode haver a contaminação do meio ambiente e conseqüentemente de alimentos e pessoas (LUCHINI e ANDRÉA, 2000). Sousa *et al.*, (2016) mostraram a falta de cuidado dos agricultores ao manusear e ao descartar os recipientes de agrotóxicos. Nessa pesquisa 47% dos entrevistados não fazem a lavagem de maneira adequada antes do descarte e 57% deles jogam as embalagens vazias em seus terrenos, causando a contaminação do meio ambiente e conseqüentemente à saúde humana.

Cerca de dois terços da população brasileira é exposta a esses agentes químicos e conseqüentemente a seus efeitos nocivos. Segundo Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) 6.802 casos foram registrados de intoxicação humana por agrotóxicos (agrícolas e domésticos) no Brasil, em 2012 (SINITOX, 2012). Essa contaminação ocorre em diferentes níveis, devido ao uso domiciliar destes compostos no combate de vetores transmissores de doenças, e ao consumo de alimento e água contaminados (PERES *et al.*, 2005). No entanto, o grupo mais vulnerável a intoxicação são os trabalhadores rurais, que possuem um contato direto com a matriz do problema e geralmente não usam equipamentos de proteção individual (EPI's) (LONDRES *et al.*, 2011). Além disso, indicadores socioeconômicos mostram que essas pessoas normalmente apresentam baixo grau de escolaridade, o que muitas vezes torna difícil a compreensão dos rótulos dos produtos adquiridos. Sousa *et al.* (2016) demonstraram a falta de uso dos equipamentos de proteção, mostrando que 73% dessas pessoas não possuem EPI's e 44% já apresentaram algum tipo de sintomas de intoxicação ao aplicar os agrotóxicos. Os autores argumentam que grande parte desse problema ocorre

---

devido à baixa escolaridade dos entrevistados, que têm dificuldade na compreensão da bula, normas e do receituário agrônomo. Esses dados provam que a carência de informações os tornam mais vulneráveis para cometerem erros no manejo dos agrotóxicos, o que aumenta as chances de sua contaminação (PERES *et al.*, 2005).

Cientes de toda esta problemática, pesquisadores do campo da saúde vêm estudando o uso de agrotóxicos e suas consequências sobre a saúde humana. Estes estudos não visam apenas à segurança no trabalho do grupo de maior risco, através do uso de EPI's, eles querem gerenciar os riscos e as incertezas relacionados ao uso desses insumos através do uso de medidas coletivas, como: a adoção de medidas educacionais, conscientização da população e fiscalizações frequentes dos órgãos responsáveis (FREITAS e BRITO SÁ, 2003).

As análises toxicológicas têm importância crucial nas investigações *antemortem* e *post-mortem*, através da determinação e quantificação de substâncias exógenas - como drogas e agrotóxicos - em tecidos e fluídos biológicos. Esses estudos permitem relacionar as concentrações dessas substâncias com seus efeitos tóxicos no organismo e assim estabelecer se houve ou não a intoxicação (BRODIN *et al.*, 2015).

As amostras mais utilizadas para determinar resíduos de agrotóxicos em humanos são o sangue e a urina, mas avanços nas técnicas de preparo de amostras e inovações tecnológicas possibilitaram o uso de matrizes como cabelo e tecidos de fígados, rins, entre outros. Além disso, os métodos de análise toxicológica, que evidenciem a presença de substâncias exógenas, estão se tornando mais sensíveis, o que possibilita a análise em nível de traço de amostras cada vez mais complexas. As técnicas cromatográficas são as mais utilizadas por apresentar maior sensibilidade, compatibilidade com a concentração dos compostos de interesse e por permitir a confirmação da presença do analito através do espectrômetro de massas (BRODIN *et al.*, 2012; BRODIN *et al.*, 2015).

Entretanto, a análise dessas amostras complexas, exige o uso ou desenvolvimento de métodos de preparo de amostra, que permitam determinar de forma segura a presença dos compostos de interesse, removendo substâncias que interfiram no sinal do analito ou que não sejam compatíveis com a técnica de análise – um exemplo são as proteínas, que não são compatíveis com as colunas de cromatografia gasosa (QUEIROZ *et al.*, 2001). Uma técnica que vem apresentando

---

resultados satisfatórios para diversas matrizes, inclusive matrizes biológicas, é a extração com partição em baixa temperatura. Essa técnica foi desenvolvida para determinar resíduos de piretróides em leite por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons, sendo observada simultaneamente a extração e *clean-up* das amostras (GOULART *et al.*, 2010). Esta técnica também já foi utilizada para determinação rápida de benzodiazepinas em urina (MAGALHÃES *et al.* 2012).

Diante do que foi exposto, neste trabalho pretende-se otimizar e validar um método que permita avaliar a presença de resíduos de agrotóxicos em um grupo de agricultores, sendo escolhido o soro sanguíneo como matriz de estudo. Este estudo possibilitará avaliar a presença de resíduos de agrotóxicos no soro sanguíneo dessas pessoas, desenvolvendo uma técnica de microextração, em etapa única, e análise por cromatografia gasosa.

---

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Contaminação Humana

Agrotóxicos são substâncias utilizadas no controle de pragas e de doenças (PERES *et al.*, 2003). Após a Revolução Verde o consumo destes compostos cresceu no Brasil e no mundo. E como a produtividade agropecuária brasileira tornou-se altamente dependente do uso de agrotóxicos e fertilizantes químicos, o Brasil tornou-se um dos maiores consumidores de agrotóxico do mundo, chegando até a liderar o ranking de consumo de agrotóxicos em 2010 (CASSAL *et al.*, 2014; MOREIRA *et al.*, 2002).

No Brasil o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), que é um órgão federal responsável pelo registro e controle desses produtos, junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), divulgou, em 2012, a venda de 83 ingredientes ativos (IA's), sendo que este órgão só divulga as informações de venda de produtos cujos ingredientes ativos tenham no mínimo 3 empresas detentoras do registro (IBAMA). Sendo assim, no país há um número muito maior de ingredientes ativos.

Apesar das inúmeras vantagens que o uso desses agrotóxicos traz ao desenvolvimento deste modelo de produção, o chamado “uso seguro”, mostra-se ineficiente e, muitas vezes, impossível de ser seguido. Isso devido à dificuldade que os agricultores têm de seguir todas as recomendações de segurança. Por isso é de suma importância divulgar os riscos de contaminação e intoxicação que se submetem os usuários (LONDRES, 2011).

A expansão do agronegócio demanda grande uso de agrotóxicos, mas seu uso incorreto e indiscriminado pode causar a contaminação de alimentos, água e ar, etc. Com isso, a saúde humana pode ser afetada de modo direto, devido ao contato direto com o produto comercial, ou de modo indireto pela ingestão de alimentos e água contaminados, ou por contato com o meio ambiente contaminado (PERES *et al.*, 2005).

---

### 2.1.1 Contaminação Indireta e Direta

Muitas vezes o mau uso no processo de aplicação de agrotóxicos pode causar contaminação do meio ambiente. No entanto, mesmo fazendo este processo de modo adequado, há uma grande chance dos agrotóxicos atingirem o solo e a água, devido ao vento e à chuva que lava as folhas tratadas. A consequência desse frágil processo é a intoxicação humana do modo indireto. Essa contaminação ocorre pelo consumo de água e/ou alimento contaminados com resíduos de agrotóxicos (RIBAS e MATSUMURA, 2009; LONDRES *et al.*, 2011).

Estudos mostram que a água e os alimentos que chegam à mesa dos consumidores brasileiros têm exibido traços de agrotóxicos. Muitas vezes a concentração encontrada está acima do limite permitido ou ainda são detectados compostos proibidos pela legislação brasileira para aquela cultura (JARDIM e ANDRADE, 2009; LONDRES *et al.*, 2011). Trabalhos estão sendo desenvolvidos para avaliar se o nível de contaminação por agrotóxicos dos alimentos que chegam à mesa dos consumidores brasileiros estão dentro das normas vigentes. Um exemplo é o trabalho desenvolvido por Castro *et al.*, 2016, visando avaliar a qualidade dos tomates consumidos em restaurantes da cidade de Botucatu-SP. Neste estudo os autores determinaram que em alguns estabelecimentos as amostras apresentaram concentrações de imidacloprido e clorpirifós acima dos limites permitidos.

A contaminação direta geralmente ocorre em produtores rurais, ao aplicar os agrotóxicos em suas lavouras e animais. Mas também pode ocorrer durante a aragem, semeadura no campo, no cuidado dos animais, entre outros (RIBAS e MATSUMURA, 2009).

As principais vias de exposição a esses agentes tóxicos são as respiratórias, a dérmica e a oral. Muitas vezes a falta do uso de equipamentos de proteção (EPI's) está vinculada a estes casos de intoxicação (RIBAS e MATSUMURA, 2009 e JARDIM e ANDRADE, 2009;).

Pesquisas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de monitorar, de modo mais rápido e eficiente, compostos exógenos no organismo humano. Um exemplo é o método de extração em fase sólida com análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (GC/MS) que foi desenvolvido para monitorar

---

metabólitos de piretróides em urina humana. Este estudo mostrou que a concentração encontrada nos operadores dos equipamentos de controle de pragas (1291 e 2815 pg mL<sup>-1</sup>) era bem maior do que a dos indivíduos não expostos ocupacionalmente (29-497 pg mL<sup>-1</sup>). E este fato foi justificado com a ajuda dos questionários e das entrevistas, que mostraram que estes indivíduos possuíam o contato direto e não utilizavam dos equipamentos de segurança de forma adequada (ARREBOLA *et al.*, 1999).

## **2.2. Agrotóxicos**

No Brasil os agrotóxicos são definidos pela lei 7.802 de 11 de julho de 1989 (BRASIL, 2002). Essa lei regulamentou vários assuntos dentre eles a avaliação da eficiência agrônômica dos agrotóxicos e seu impacto sobre a saúde humana e meio ambiente. Além disso, essa lei define se esses produtos podem ser vendidos comercialmente, como podem ser empregados e sob quais condições, baseado em estudos físico-químicos, toxicológicos e ecotoxicológicos (LONDRES *et al.*, 2011). Um agrotóxico pode ser classificado com base em seu modo de ação, toxicidade ou em sua composição química (SILVA *et al.*, 2005).

A classificação toxicológica feita pela ANVISA se baseia nos efeitos agudos, que são os que surgem algumas horas após a exposição ao veneno, apresentados pela pessoa que manuseou o agrotóxico (LONDRES *et al.*, 2011). A toxicidade aguda é medida através da Dose Letal (Lethal Dose 50% / LD50), que é a dose necessária para que uma substância química provoque a morte de, pelo menos, 50% dos animais de estudo, geralmente ratos e camundongos (BRAIBANTE e ZAPPE, 2012).

Com a finalidade de informar e fornecendo maior segurança aos usuários a ANVISA divide os agrotóxicos em quatro classes toxicológicas (JARDIM e ANDRADE, 2009; LONDRES *et al.*, 2011). Considerando essa classificação, as categorias possíveis variam de I a IV, como pode ser visto na Tabela 1.

**Tabela 1.** Classificação dos agrotóxicos segundo o grau de toxicidade

Classe	Toxicidade	LD 50 <sub>oral</sub> / mg kg <sup>-1</sup>	Cor indicada na embalagem
Ia	Extremamente tóxico	≤5	Faixa vermelha
Ib	Altamente tóxico	5-50	Faixa vermelha
II	Moderadamente tóxico	50-2000	Faixa amarela
III	Levemente tóxico	Mais de 2000	Faixa azul
IV	Improvável apresentar perigo agudo	Mais de 5000	Faixa verde

Fonte: WHO - World Health Organization, 2010.

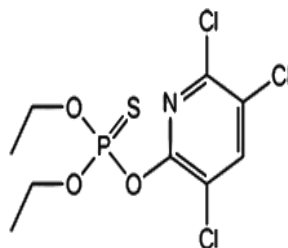
A classificação química relaciona-se com a classe química do agrotóxico, por exemplo: piretróides, organofosforados, organoclorados, carbamatos e triazois. Neste trabalho serão investigados alguns compostos da classe dos piretróides e organofosforados.

- **Organofosforados**

Os agrotóxicos organofosforados são inseticidas caracterizados pela presença de compostos de fósforo, produzidos desde o século XX. (CHAMBERS *et al.*, 2001a). Geralmente a intoxicação por estes compostos ocorre por exposição acidental através da pele e/ou vias respiratórias, mas, algumas vezes há a auto-ingestão na tentativa de suicídio (INOUE *et al.*, 2007).

Um inseticida bastante utilizado na agricultura é o clorpirifós. O clorpirifós é um inseticida sintético da classe dos organofosforados e é caracterizado pela baixa solubilidade em água. Este composto geralmente é aplicado com o intuito de controlar parasitas (insetos) foleares no cultivo de feijão, tomate, milho, café e trigo. Seu mecanismo de ação está relacionado com a inibição da enzima acetilcolinesterase, isso causa a interrupção dos impulsos nervosos devido ao acúmulo da acetilcolina, que é um neurotransmissor tóxico ao organismo dos insetos e animais. O efeito tóxico causado pelo clorpirifós no sistema nervoso é denominado neurotoxicidade tardia. Alguns sintomas são dor de cabeça, vertigens e espasmos. Mas em altas concentrações pode causar a perda ou irregularidade da coordenação

muscular, ou ainda, a paralisia dos membros (EATON *et al.*, 2008; YUAN *et al.*, 2014; MORI, 2006). A Figura 1 apresenta sua estrutura química.



**Figura 1.** Estrutura química do inseticida Clorpirifós.

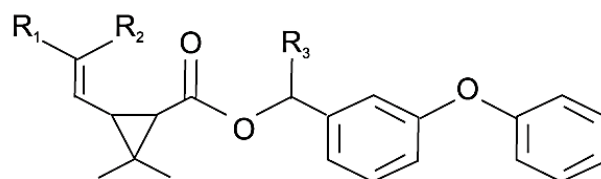
- **Piretróides**

Os piretróides apresentam uma estrutura semelhante a um componente ativo das flores do *Chrysanthemum cinerariaefolium*, chamado piretrina. Estes compostos geralmente apresentam baixo poder residual e alta eficiência em baixa dosagem. Mudanças na estrutura das piretrinas permitiram a síntese dos piretróides, compostos mais estáveis, que são aplicados no campo desde os anos 70 (SANTOS *et al.*, 2007).

A bifentrina, a  $\lambda$ -cialotrina, permetrina e a deltametrina são inseticidas sintéticos geralmente utilizados no plantio de algodão, batata, café, melancia, tomate, entre outros. Como os piretróides são misturas estereoisoméricas, sua atividade biológica e toxicidade dependem das estruturas químicas e da configuração estérica (SANTOS *et al.*, 2007; MAŠTOVSKÁ e LEHOTAY, 2004).

Alguns piretróides são divididos em dois grupos, os que não apresentam e os que apresentam o grupo cianeto (CN) na posição  $\alpha$ , ao grupo aromático (Nasuti *et al.*, 2003). Os compostos que não apresentam este grupamento demonstram a denominada síndrome do envenenamento (síndrome T), que causam comportamento agressivo, tremores no corpo e convulsões em ratos e paralisia momentânea em outros mamíferos. Já na presença do grupamento cianeto, os sintomas demonstrados pelos ratos foram hipersensibilidade, tremores, convulsões crônicas, entre outros, e a síndrome foi denominada síndrome Choreathetosis (Síndrome do CS) (VERSCHOYLE e ALDRIDGE, 1980).

A estrutura de alguns piretróides sintéticos está representada na Figura 2 e o que diferencia as moléculas são as substituições nos grupos R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>, como pode ser visto na Tabela 2.

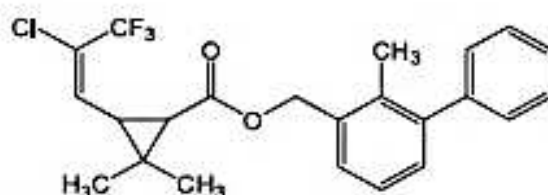


**Figura 2.** Estrutura química base de piretróides sintéticos.

**Tabela 2.** Substituintes dos radicais R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub> na estrutura base dos piretróides

<b>Piretróides</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
Permetrina	Cl	Cl	H
λ-cialotrina	Cl	CF <sub>3</sub>	CN
Deltametrina	Br	Br	CN

Dos exemplos citados, apenas a bifentrina apresenta outros substituintes e sua estrutura está representada na Figura 3.



**Figura 3.** Estrutura química da bifentrina.

### 2.3. Efeitos na Saúde Humana

Por atuarem em processos vitais, grande parte dos agrotóxicos tem ação venenosa sobre o organismo humano e seus principais efeitos são: intoxicação aguda e crônica (PERES *et al.*, 2003).

Os efeitos crônicos são caracterizados pelos sintomas tardios, que surgem de exposições pequenas e médias por longos períodos – meses ou anos. Esses efeitos são característicos de intoxicações ocupacionais e/ou pelo contato indireto, consumindo alimento e água contaminada. Os efeitos mais comuns são perda de peso, fraqueza muscular, irritabilidade, insônia, infertilidade, malformação congênitas, doenças respiratórias, entre outros. O amplo leque de sintomas dificulta

---

o diagnóstico desse tipo de intoxicação e muitas vezes tornam seus efeitos irreversíveis, como ocorre no caso de câncer ou de paralisia (LONDRES, 2011; RIBEIRO e MELLA, 2007).

Os efeitos agudos são aqueles que resultaram da exposição em altas concentrações de compostos altamente tóxicos. Alguns dos sintomas são: dores de cabeça, náuseas, vômito, dificuldade respiratória, tremores, convulsões, entre outros. Geralmente eles surgem rapidamente - em menos de 24 horas - e podem ocorrer de forma leve, moderada ou grave. Em alguns casos podendo levar à morte. Esses casos geralmente estão relacionados com o contato direto com os agrotóxicos, o que tornam os agricultores suas principais vítimas (LONDRES, 2011; RIBEIRO e MELLA, 2007).

Outro fator de grande relevância e que é uma prática comum no campo, é o emprego de formulações contendo dois ou mais agrotóxicos, em um só produto, para melhorar a eficácia do controle de pragas. No entanto, as consequências dessas misturas no organismo vivo podem ser graves, pois a toxicidade das misturas não será a soma da atividade tóxica de cada composto. Novos efeitos poderão ser gerados pela interação destes compostos, podendo estes serem mais graves que os provocados pelos agrotóxicos isoladamente (LONDRES, 2011; CASTRO e CHIORATO, 2007).

#### **2.4. Matrizes Biológicas**

Diversas amostras biológicas podem ser utilizadas para determinar a presença de compostos exógenos em diferentes organismos. Sangue, urina, cabelo, saliva, suor e tecidos moles são algumas delas. A escolha da melhor matriz a ser analisada depende de muitos fatores, alguns deles são: tipo de análise (*postmortem* ou *antemortem*), modo de coleta, tipo de analito a ser estudado e suas características, modo com que ele foi introduzido no organismo, entre outros (BRODIN *et al.*, 2015).

O desenvolvimento das técnicas de preparo de amostra e instrumentais, permitem uma análise de traços em matrizes complexas, tornando-as mais seletivas e sensíveis. Com isso, matrizes não convencionais estão sendo amplamente utilizadas nos dias atuais (WAHLUND, 1981; GILAR *et al.*, 2001 e OLIVEIRA *et al.*,

---

2008). Klima *et al.* (2016), desenvolveram métodos para análise de medicamentos e drogas ilícitas em tecidos dentais, cabelos e fluidos corporais. Mesmo assim, sangue e a urina são as matrizes mais utilizadas, principalmente devido à maior concentração dos analitos nas amostras.

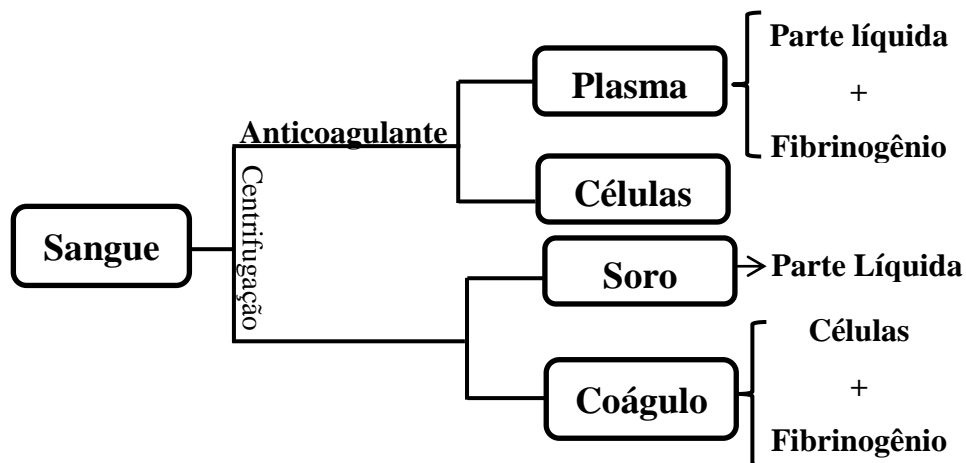
#### **2.4.1. Sangue**

O sangue é o meio líquido do sistema circulatório que flui entre diversos órgãos, transportando nutrientes, hormônios, água, substâncias exógenas, entre outros. O volume total de sangue no corpo está entre 4 e 8 litros, dependendo do sexo da pessoa e do porte físico dos indivíduos. Geralmente um adulto tem cerca de 60 mL de sangue por cada quilograma (kg) de massa corporal (SOUZA *et al.*, 2006).

Este é um fluido complexo, contém água, proteínas solúveis, gordura, sais e células. O sangue se tornou uma matriz convencional porque fornece uma correlação adequada entre a concentração do analito e os efeitos clínicos causados por ele. Além disso, permite estimar a quantidade administrada desse composto e avaliar a razão entre a concentração do princípio ativo e a do seu metabólito (BRODIN *et al.*, 2015).

Outra característica importante dessa amostra é sua curta janela de análise (tempo em que o analito ou seus metabolitos ficam no organismo da pessoa), que geralmente dura entre algumas horas e poucos dias da dose do analito ser administrada (BRODIN *et al.*, 2015). Além disso, a amostragem deve ser realizada cuidadosamente, uma vez que esta é invasiva, podendo causar a contaminação do paciente ou do analista (OLIVEIRA *et al.*, 2008; BRODIN *et al.*, 2015).

O sangue pode ser avaliado na forma de sangue total, plasma ou soro, sendo os dois últimos obtidos após a centrifugação do sangue e diferenciados pela presença ou não de fibrinogênio (GOMES, 2013). O desenho esquemático apresentado na Figura 4 apresenta as possíveis formas em que se pode utilizar o sangue como matriz.



**Figura 4.** Desenho esquemático das diferentes formas em que o sangue pode ser avaliado.

#### 2.4.2. Soro

O sangue é uma suspensão de células em um líquido complexo (plasma), que é constituído por água, sais minerais, proteínas, lipídios, entre outros. Em cada litro (L) desse fluido há cerca de 70 gramas de proteínas, sendo a maior parte constituída por albumina, mas também há globulinas e fibrinogênio (SOUZA et al, 2006).

O soro sanguíneo é obtido a partir da centrifugação do sangue, assim como o plasma. A diferença entre eles está na adição ou não de anticoagulante, no momento da coleta (BRODIN *et al.*, 2015).

No processo de coagulação os fibrinogênios, que são proteínas, formam monômeros de fibrinas, que por fim geram redes de fios que aprisionam eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Então o soro é o sobrenadante do processo de centrifugação do sangue quando não há a adição de anticoagulante, ou seja, é o plasma sanguíneo na ausência de fibrinogênios, Figura 5, (SANTOS, 2007; SOUZA et al, 2006).



**Figura 5.** Imagem de sangue humano e este centrifugado mostrando a separação do soro (parte líquida) e o coágulo.

Essa matriz já foi utilizada em vários estudos, como por exemplo, a análise de

---

agrotóxicos organoclorados no soro humano usando microextração em fase sólida por headspace e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (KIM *et al.*, 2013). Uma determinação rápida e simultânea de agrotóxicos organofosforados no soro humano por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas também foi proposta por Inoue *et al.*, 2007.

## 2.5. Técnicas de extração

O preparo da amostra é uma etapa crucial de um método analítico. Seus principais objetivos são: converter a matriz em estudo em uma amostra adequada para análises instrumentais, remover interferentes da matriz, aumentando a seletividade do método, e, se possível e necessário concentrar o analito. Além disso, idealmente o método deve ser robusto e reproduzível (SMITH, 2003).

Assim como para outros tipos de análises, na toxicologia um pré-tratamento eficiente das amostras é a chave para o sucesso das análises. Essa etapa do método de análise é uma ferramenta que visa auxiliar no monitoramento das substâncias exógenas no organismo humano, determinando suas concentrações, para que por fim seja possível relacionar estes valores com os efeitos tóxicos apresentados pelos indivíduos que estão sendo objeto de estudo. Além disso, permite estabelecer se houve ou não intoxicação (BORDIN *et al.*, 2015).

Técnicas clássicas, tais como Extração Líquido-Líquido (LLE, *Liquid-Liquid Extraction*) e Extração em Fase sólida (SPE, *solid phase extraction*), são bastante utilizadas para determinação de agrotóxicos em alimentos, amostras ambientais e amostras biológicas (KRISTENSON *et al.*, 2006 e MOREIRA *et al.*, 2015).

A extração líquido-líquido foi empregada com sucesso para a determinação de substâncias exógenas em soro sanguíneo, sangue, urina e outros fluidos corporais humanos (INOUE *et al.*, 2007 e; GOTTZEIN *et al.* 2009). A extração sólido-líquido também foi empregada para determinar a presença de agrotóxicos em soro humano e em água (BARRIONUEVO *et al.*, 2001 e THOMAS *et al.*, 2017). Recentemente, DUCA *et al.* (2014) aplicaram as duas técnicas em amostras de cabelo. Inicialmente as amostras, descontaminadas (eliminação de impurezas superficiais) e pulverizadas, foram incubadas com 1 mL de acetonitrila, a 40 °C, para obter o extrato. Esse extrato foi purificado aplicando a técnica SPE ou a ELL. Ao comparar resultados das duas técnicas os autores concluíram que a extração em

---

fase sólida é mais adequada, pois essa técnica extraiu um maior número de compostos e promoveu uma maior recuperação.

Apesar da eficiência das técnicas convencionais (SPE, ELL), estas são mais caras, demoradas e consomem grande quantidade de material. Em função disso, o desenvolvimento de técnicas mais rápidas e eficazes, visando baixo custo e menor contaminação ambiental foi necessário (KRISTENSON *et al.*, 2006 e MOREIRA *et al.*, 2015). Assim as técnicas clássicas passaram por processos de miniaturização, sendo reduzido o tamanho da amostra, a quantidade de solvente, tempo de preparo da amostra, etc. Neste contexto, as técnicas para análise de resíduos de agrotóxicos também evoluíram tornando-se mais simples, promovendo melhor extração e purificação das amostras. Entre estas novas técnicas destacam-se as técnicas de extração líquido - líquido (ELL) e sólido - líquido (ESL) com partição em baixa temperatura (PBT). Estas técnicas vêm sendo amplamente utilizadas para remoção de agrotóxicos em alimentos, água e solo. Uma grande vantagem da partição em baixa temperatura é realizar simultaneamente a extração e o *clean-up* das amostras com obtenção de extratos adequados para análise.

Em 2004, GOULART desenvolveu o método extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura foi desenvolvido por (2004) que determinou de piretróides em leite por cromatografia gasosa (ELL/PBT-GC/ECD). Essa técnica foi empregada para a extração de carbamatos em amostras de água com grande eficiência (GOULART *et al.*, 2010). A base dessa técnica é adicionar uma mistura extratora à matriz, sólida ou líquida, e, após homogeneização, resfriar a mistura até que ocorra a separação das fases por congelamento da fase aquosa ou desta juntamente com a fração sólida da matriz. O sobrenadante, contendo o solvente orgânico e os analitos de interesse, é recolhido e analisado. Esta técnica é simples, envolve baixo consumo de solvente (acetonitrila, acetato de etila, metanol e acetona), geralmente não necessita de etapas de clean-up, muitas vezes requeridas em vários outros métodos de extração.

No entanto algumas vezes o extrato coletado precisa ser concentrado, tornando necessária uma nova etapa, em que o extrato é evaporado até a *secura* e recuperado em um volume menor de solvente orgânico. Outra alternativa é hifenar a partição em baixa temperatura com microtécnicas como a microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD), para este mesmo fim.

---

Essa técnica foi aplicada para extração de agrotóxicos em ovos de jacarés (SOUSA *et al.*, 2014) e em manteiga (MARTHE *et al.*, 2010) e na extração de drogas em urina (MAGALHAES *et al.*, 2012). Em todos estes trabalhos o método se mostrou eficaz, simples e consumiu um menor volume de solventes, mostrando-se muito vantajoso.

## 2.6. Técnicas de análise química

A necessidade de se obter medidas analíticas confiáveis, comparativas e de qualidade, vem crescendo cada vez mais, pois dados duvidosos podem conduzir a decisões errôneas e gerar prejuízos (financeiros, ambientais e/ou à vida humana). Por isso, para obter um método sensível, a ponto de determinar a presença de traços de substâncias exógenas em amostras biológicas, além de um bom preparo de amostra é necessário empregar uma técnica instrumental que ajude na separação, no caso de análises mutiresíduos, sem influência de interferentes, identificação e quantificação dos analitos (RIBANI *et al.* 2004 e BORDIN *et al.* 2015).

As técnicas mais utilizadas para a determinação de contaminantes em amostras biológicas são as cromatográficas, principalmente a cromatografia em fase gasosa (CG) ou em fase líquida (CL) acoplada à espectrometria de massas (EM) (BORDIN, *et al.*, 2015). No entanto, outros detectores podem ser utilizados com grande eficiência, identificando e quantificando os analitos, com excelentes limites de detecção na faixa de nanogramas a microgramas por litro ( $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (GALLI *et al.*, 2006).

Os cromatógrafos acoplados à espectrometria de massas são mais utilizados, pois além de determinar a concentração do analito, eles permitem confirmar com mais segurança a sua presença. FISICHELLA *et al.*, (2015) empregaram com sucesso a microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD) e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS) para a determinação de benzodiazepinas e outros medicamentos em amostras de sangue.

No entanto, outros detectores já foram utilizados com sucesso para determinação de contaminantes em diversas amostras. Um exemplo é o trabalho de Arjomandi-Behzad *et al.*, 2014 que utilizaram a técnica de cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (CG-DIC) para determinar a piridina em amostras de urina. Este trabalho desenvolveu um método de extração de eletromembrana

---

acoplada com microextração líquido-líquido dispersiva que se mostrou simples e rápido. Já Freire, E. F. *et al.*, 2005 utilizaram a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de ultravioleta na análise do diazepam e de nordiazepam, que é seu metabolito activo, em plasma.

---

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo geral

Desenvolver um método de microextração em fase única para determinar resíduos dos agrotóxicos em soro sanguíneo bovino e humano por cromatografia gasosa.

### 3.2. Objetivos específicos

- Determinar as condições cromatográficas ideais para separação dos agrotóxicos clorpirifós, bifentrina,  $\lambda$ -cialotrina e deltamentrina;
- Avaliar alguns parâmetros como volume de amostra, volume de solvente extrator e tempo de agitação para otimizar a técnica de microextração líquido-líquido com partição em baixa temperatura para determinação de clorpirifós, bifentrina,  $\lambda$ -cialotrina e deltamentrina em soro fetal bovino por cromatografia gasosa;
- Validar o método otimizado em soro fetal bovino por cromatografia gasosa;
- Avaliar a estabilidade dos analitos no soro fetal bovino;
- Avaliar a viabilidade de aplicar o método otimizado para soro fetal bovino, em soro sanguíneo humano;
- Aplicar o método otimizado e validado para avaliar o nível de contaminação por resíduos de clorpirifós, bifentrina,  $\lambda$ -cialotrina e deltamentrina em soro sanguíneo de produtores rurais voluntários.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Reagentes e Soluções

Os solventes e padrões utilizados foram:

- acetonitrila, 99,5% - grau HPLC (Sigma-Aldrich, USA) – CAS 75-05-8
- clorpirifós, 99,0% m/m, (Sygenta, Brasil) – CAS 2921-88-2
- $\lambda$ -cialotrina, 86,5% m/m, (Sygenta, Brasil) – CAS 91465-08-6
- deltametrina, 99% m/m (Sygenta, Brasil) – CAS 52918-63-5
- bifentrina-92,2% m/m (FMC, Brasil) – CAS 82657-04-3

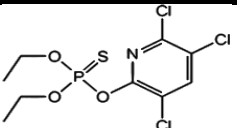
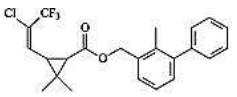
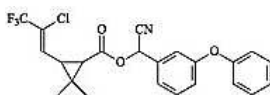
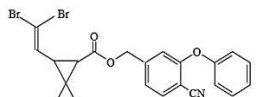
Os agrotóxicos utilizados neste estudo foram selecionados com o auxílio dos questionários aplicados pelo aluno Breno César Vieira. Além disso, foram avaliados os cultivos da região de estudo e efeitos nocivos que os agrotóxicos podem causar ao ser humano. A Tabela 3 apresenta os analitos em estudo e os relaciona com seu grupo químico, fórmula atômica, classificação quanto ao modo de ação e toxicologia.

Uma solução-estoque na concentração  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina e bifentrina e com  $35,4 \text{ mg L}^{-1}$  de deltametrina foi preparada em acetonitrila. Para testes preliminares e otimização do método, esta solução foi diluída em 100 vezes com o mesmo solvente, para obter a solução de trabalho 1.

Para a etapa de validação, preparou-se uma solução contendo clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina e bifentrina na concentração  $1 \text{ mg L}^{-1}$  e deltametrina a  $2 \text{ mg L}^{-1}$ . Esta solução foi denominada solução de trabalho 2.

Estas soluções foram armazenadas em freezer Consul à temperatura de aproximadamente a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Tabela 3.** Agrotóxicos estudados e suas características físico-químicas

Agrotóxico	Formula atômica	MM / g mol <sup>-1</sup>	LD50 <sub>Aguda</sub> / mg kg <sup>-1</sup>	CL50/ mg L <sup>-1</sup>	LD50 <sub>Dérmico</sub> / mg kg <sup>-1</sup>	ADI/ mg kg <sup>-1</sup>	Classificação quanto ao modo de ação	Classificação toxicológica
Clorpirifós		350,89	64	0,1	>1250	0,001	Inseticida	Classe II
Bifentrina		422,88	54,5	1,01	>2000	0,015	Inseticida e acaricida	Classe III
λ-cialotrina		449,85	56	0,066	>632	0,0025	Inseticida	Classe III
Deltametrina		505,20	87	0,6	>2000	0,01	Inseticida, metabólito e substância veterinária	Classe III

ADI - Ingestão Diária Aceitável

CL50 – mede a intoxicação por inalação

LD50<sub>agudo</sub> – mede a intoxicação aguda por via oral. Este valor é a metade da dose necessária para que uma substância química provoque a morte

LD50<sub>dérmico</sub> – medea intoxicação devido a contato direto com a superfície da pele.

Fonte: IUPAC, 2007.

## 4.2. Instrumentação

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-2014, com detector por captura de elétrons (DCE), equipado com auto-injetor AOC-20i e/ou em um cromatógrafo a gás Agilent, modelo 7820A GC, equipado com auto-injetor G4513A, acoplado a um espectrômetro de massas, modelo 5977B MDS.

As condições cromatográficas como, programação de temperatura da coluna, temperaturas do injetor e do detector, modo de injeção, e vazão do gás de arraste, etc. foram adaptadas de NORONHA *et al.*, 2015. As condições ideais da análise por CG/DCE se encontram descritas a seguir:

- Coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm x 0,10  $\mu\text{m}$  de espessura de filme), da Phenomenex (USA), modelo ZB-5 (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano).

- Programação de aquecimento da coluna:

150 °C (1 min)  $\xrightarrow{30\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}}$  210 °C (1 min)  $\xrightarrow{30\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}}$  250 °C (2 min)  $\xrightarrow{20\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}}$   
290 °C (2 min)

- Tempo total de análise: 11,3 min
- Temperatura do injetor: 280 °C
- Temperatura do detector: 300 °C
- Volume injetado: 1,0  $\mu\text{L}$
- Razão de Split: 1:5
- Gás de arraste: nitrogênio
- Vazão do gás de arraste: 1,2 mL min<sup>-1</sup>

Tendo em vista que as condições cromatográficas estabelecidas forneceram boa resolução em um curto tempo de análise, estas foram adaptadas para o CG/EM. As condições ideais da análise por CG/EM foram:

- Coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme), da Hexis, modelo HP-5MS (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano).

- Programação de aquecimento da coluna:

150 °C (1 min)  $\xrightarrow{30\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}}$  290 °C (6,34 min)

- Tempo total de análise: 12,01 min
- Temperatura do injetor: 280 °C

- Temperatura do detector: 300 °C
- Volume injetado: 1,0 µL
- Splitless
- Monitoramento modo SIM e TIC
- Fonte de ionização: impacto de elétrons 70 eV
- Analisador: *Single quadrupole*
- Gás de arraste: nitrogênio
- Vazão do gás de arraste: 1,2 mL min<sup>-1</sup>

Outros equipamentos foram:

- Balança analítica modelo BP221 S (SARTORIUS, Göttingen, Alemanha);
- Agitador vórtex modelo CERTOMAT® MV (B. BRAUN INTERNACIONAL, Melsugen, Alemanha);
- Freezer 280 L modelo CVU30DBANA (CONSUL, Minas Gerais, Brasil).

#### 4.3. Amostras

Para otimização e validação do método de extração utilizou-se soro fetal bovino (Cultilab), inativo, estéril e isento de mycoplasma, que foi gentilmente doado pelo professor José Humberto de Queiroz, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

O método otimizado e validado para soro fetal bovino foi aplicado em amostras de soro sanguíneo humano a fim de avaliar se os compostos dessa matriz iriam interferir na análise. Posteriormente, amostras de soro fetal bovino e soro sanguíneo foram fortificadas com 100 µg L<sup>-1</sup> de clorpirifós, bifentrina, λ-cialotrina e com 200 µg L<sup>-1</sup> de deltametrina e submetidas ao método de extração para comparar a eficiência da extração.

Após avaliar a seletividade e eficiência do método para amostras humanas este foi empregado para determinar a presença de clorpirifós, λ-cialotrina e bifentrina e deltametrina no organismo de trabalhadores rurais.

As amostras de sangue humano foram coletadas pelo aluno de doutorado Breno Cesar Vieira, cujo projeto intitulado “Análise proteômica e perfil bioquímico do sangue dos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos”, está sendo executado no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.

Maria Goreti de Almeida Oliveira. Este projeto, com número de protocolo 1.052.863, foi devidamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da UFV.

Conforme informações contidas no projeto do estudante Breno César Vieira, um questionário foi aplicado para se identificar os voluntários que faziam o uso de álcool ou fumo, ou qualquer tipo de droga sintética ou natural - que são substâncias que podem alterar os parâmetros bioquímicos, enzimáticos ou a expressão de proteínas. Assim foram selecionados indivíduos não expostos, para controle, e indivíduos expostos aos agrotóxicos (trabalhadores), cada um destes dois grupos continha 20 indivíduos, do sexo masculino entre 30-60 anos. Os voluntários selecionados para o grupo controle não tiveram contato direto com qualquer classe de agrotóxicos. Já o grupo dos trabalhadores rurais foi composto por indivíduos expostos aos agrotóxicos em qualquer uma de suas atividades durante o cultivo de tomates, em diferentes comunidades do município de Coimbra – Minas Gerais, Brasil.

As amostras biológicas coletadas foram rotuladas e armazenadas de maneira adequada, em freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para serem utilizadas em pesquisas complementares, como a que foi executada neste trabalho.

#### **4.5. Extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT)**

Para a etapa de otimização, aos frascos de vidro transparente de 5 mL foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de amostras de soro sanguíneo fortificadas com 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  de clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina e 17,7  $\mu\text{g L}^{-1}$  de deltametrina (para este preparo foi empregada a solução de trabalho 1). Para a etapa de validação e os estudos de estabilidade as amostras de soro sanguíneo foram fortificadas com 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  de clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  de deltametrina, sendo utilizada para este preparo, a solução de trabalho 2.

Às amostras de soro fortificadas adicionaram-se 1000  $\mu\text{L}$  de água e posteriormente 500  $\mu\text{L}$  de solvente orgânico (acetonitrila: 99,5% - grau HPLC - Sigma-Aldrich,USA). A mistura foi agitada em vórtex por 1 min à temperatura ambiente e resfriada em freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por aproximadamente 12 h. Após a separação das fases pelo congelamento da fase aquosa (soro + água + proteínas) aproximadamente 100  $\mu\text{L}$  do extrato líquido sobrenadante (acetonitrila) foi recolhido, transferido para um *vial* contendo um *insert*. Quando necessário, os extratos foram

armazenados em freezer, até o momento da análise por CG/DCE, e em alguns casos por CG/EM, nas condições analíticas previamente estabelecidas.

#### 4.5.1. Otimização da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura

No processo de otimização desta técnica alguns parâmetros importantes foram avaliados empregando um planejamento fatorial completo  $2^3$  com ponto central (n=2), envolvendo 10 ensaios. As variáveis estudadas foram volume de água, volume do solvente extrator e tempo de agitação. Os dados do planejamento são apresentados na Tabela 4. As concentrações obtidas nas análises cromatográficas foram utilizadas como respostas analíticas.

**Tabela 4.** Planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central (n=2) aplicado na otimização da ELL-PBT de amostras de soro sanguíneo com as três variáveis e os seus códigos

Fatores	Níveis de amostragem		
	-1	Ponto Central	+1
(F1) Ajuste da diluição / $\mu\text{L}$	700	850	1000
(F2) Volume de extrator / $\mu\text{L}$	500	600	700
(F3) Tempo de extração / s	20	40	60

Ensaio	Fatores codificados		
	F1	F2	F3
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	-	+
4	-	+	-
5	-	+	+
6	+	+	-
7	+	-	+
8	+	+	+
9	0	0	0
10	0	0	0

#### **4.6. Estabilidade dos analitos**

Para a avaliação da estabilidade dos analitos na matriz, foram preparados 25 mL de soro sanguíneo fortificado a partir da solução trabalho 2 com 50 µg L<sup>-1</sup> de clorpirifós, bifentrina e λ-cialotrina e 100 µg L<sup>-1</sup> de deltametrina. O soro fortificado foi dividido em alíquotas de 500 µL cada, metade delas foi armazenada em freezer a -20 °C ± 2 °C e a outra metade foi armazenada na geladeira a 4 °C ± 2 °C. Essas amostras foram retiradas em triplicatas no 3º, 7º, 11º, 15º e 23º e submetidas ao método otimizado. Os extratos obtidos em cada dia de análise foram recolhidos e analisados por cromatografia gasosa.

#### **4.7. Validação do método analítico**

O método de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura e análise por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons, otimizado para determinação de resíduos de agrotóxicos em soro sanguíneo foi validado para as principais figuras de mérito. Foram avaliados seletividade, linearidade de resposta do método, limite de detecção e limite de quantificação, exatidão (ensaios de recuperação), precisão (repetitividade e precisão intermediária) e efeito de matriz. Os procedimentos realizados para a validação do método otimizado, foram baseados em recomendações de CASSIANO *et al.*, 2009; RIBANI, *et al.*, 2004; ANVISA (2003), muitos outros.

##### **4.7.1. Seletividade**

A seletividade foi avaliada pela comparação dos cromatogramas dos extratos do branco de soro sanguíneo (isento dos agrotóxicos de estudo) com os cromatogramas dos extratos obtidos da matriz fortificada.

##### **4.7.2. Linearidade da resposta do método**

A linearidade de resposta do método foi feita em triplicatas, injetando extratos das amostras de soro sanguíneo submetidas ao método proposto em 7 níveis de

concentrações - de 5, 20, 35, 50, 75, 100 e 125  $\mu\text{g L}^{-1}$  para clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina e de 10, 40, 70, 100, 150, 200 e 250  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a deltametrina.

#### 4.7.3. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) podem ser obtidos utilizando as equações 2 e 3.

$$LD = \frac{3 SD}{B} \quad (\text{Equação 2})$$

$$LQ = \frac{10 SD}{B} \quad (\text{Equação 3})$$

Sendo:

SD = Estimativa das áreas obtidas para o branco

B = Inclinação da curva analítica obtida pela injeção e análise por CG/DCE dos extratos que foram obtidos após submeter as amostras de soro sanguíneo ao método otimizado.

#### 4.7.4. Exatidão

Ensaio de recuperação foram feitos para determinar a exatidão do método, neles as amostras de soro sanguíneo foram fortificadas em concentrações iguais 20, 50 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  para clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina e de 40, 100 e 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a deltametrina. Estes experimentos foram feitos em triplicata e a exatidão foi avaliada pela porcentagem de recuperação (%R) conforme a equação 4.

$$\%R = \left[ \frac{C_E \times 100}{C_R} \right] + 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Sendo:

$C_E$  = Média das concentrações obtidas experimentalmente

$C_R$  = Concentração real (concentração em que as amostras foram fortificadas)

#### 4.7.5. Precisão

A precisão representa a dispersão de seus resultados em ensaios diferentes e sua avaliação se dá pela estimativa do coeficiente de variação (CV) conforme a equação 5.

$$CV = \left( \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \right) \quad \text{(Equação 5)}$$

Sendo:

s = Desvio padrão das áreas obtidas

$\bar{x}$  = média entre as áreas obtidas

A precisão do método foi avaliada, por um estudo intralaboratorial, onde se analisaram a repetitividade e a precisão intermediária.

##### 4.7.5.1. Repetitividade

A repetitividade foi avaliada utilizando o guia da ANVISA (2003) como base. O experimento foi feito em 3 níveis de concentração (20, 50 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  para clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina e de 40, 100 e 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a deltametrina). Os ensaios foram realizados em triplicata. Para tal estimativa, foram determinados os coeficientes de variação (CV) e as porcentagens de recuperação dos agrotóxicos em estudo (%R) de cada agrotóxico.

##### 4.7.5.2. Precisão intermediária

A estimativa da precisão do método foi feita por meio da porcentagem de recuperação (%R) dos agrotóxicos em estudo, e seus respectivos coeficientes de variação (CV), que foram obtidos pela análise dos extratos em 3 níveis de concentração (20, 50 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  para clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina e de 40,

100 e 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a deltametrina) e em triplicata, de amostras que foram submetidas à técnica de extração otimizada.

#### **4.8. Análise de agrotóxicos em amostras de soro sanguíneo de agricultores**

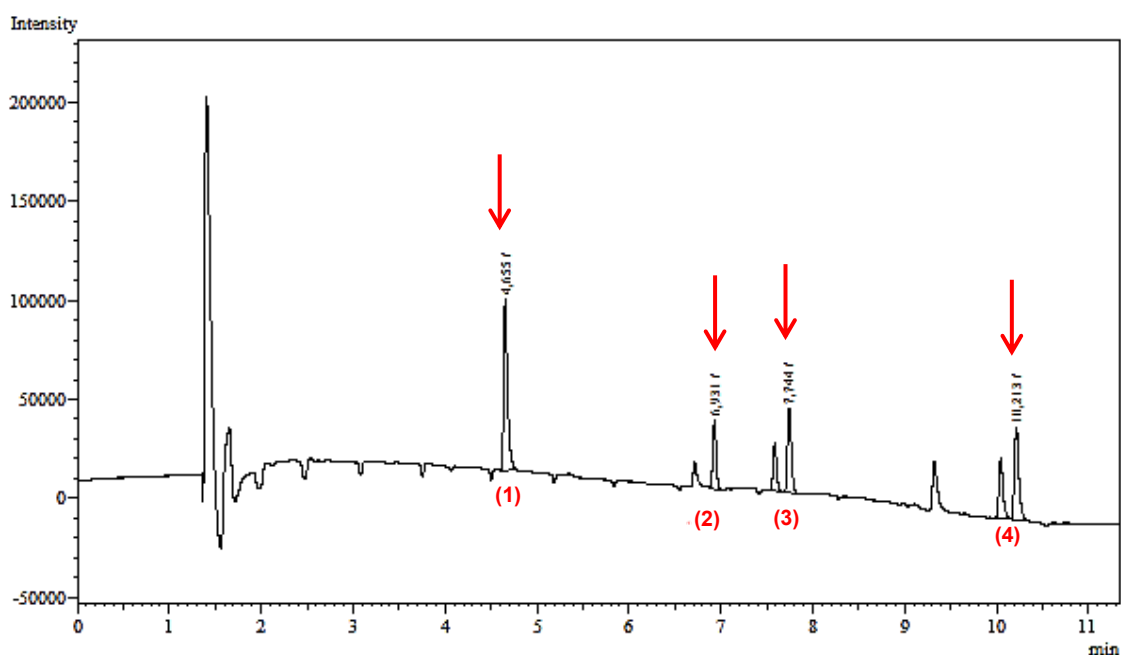
O método otimizado e validado foi aplicado para determinação de resíduos dos agrotóxicos clorpirifós, bifentrina,  $\lambda$ -cialotrina e deltametrina em soro sanguíneo de um grupo de trabalhadores rurais e de indivíduos que não tiveram contato direto com agrotóxicos.

Foram analisadas 10 amostras de soro sanguíneo, sendo duas destas controle. Essas amostras foram submetidas ao método otimizado e validado, permitindo avaliar o nível de intoxicação dos agricultores.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Análise cromatográfica

O cromatograma de uma solução-padrão, em acetonitrila, contendo  $300 \mu\text{g L}^{-1}$  de clorpirifós, bifentrina,  $\lambda$ -cialotrina e  $600 \mu\text{g L}^{-1}$  de deltametrina foi obtido utilizando as condições descritas no item 4.2 em um CG/DCE e o tempo total de análise foi de 11,3 minutos. O cromatograma está representado na Figura 6. Nota-se que os picos forão simétricos e que essas condições cromatográficas forneceram uma boa resolução, pois não houve sobreposição de picos. Os tempos de retenção, apresentados na Tabela 5, foram similares aos obtidos por NORONHA *et al.*, 2015.



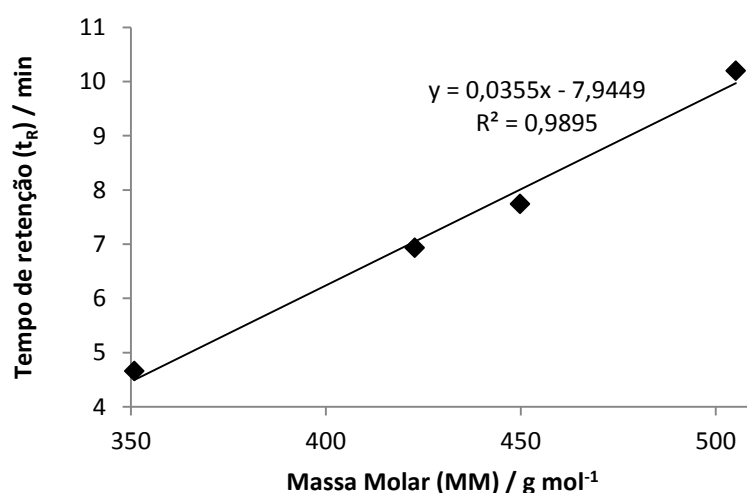
**Figura 6.** Cromatograma de uma solução-padrão dos agrotóxicos em acetonitrila nas concentrações de  $300 \mu\text{g L}^{-1}$  para o clorpirifós, bifentrina,  $\lambda$ -cialotrina e  $600 \mu\text{g L}^{-1}$  para a deltametrina, em que (1)  $t_R = 4,66$  min: clorpirifós; (2)  $t_R = 6,93$  min: bifentrina; (3)  $t_R = 7,74$  min:  $\lambda$ -cialotrina; (4)  $t_R = 10,2$  min: deltametrina.

Pode-se observar que a ordem de eluição dos analitos está relacionada com suas respectivas massas molares (MM).

**Tabela 5.** Tempo de retenção dos agrotóxicos nas condições cromatográficas e suas respectivas massas molares.

Ordem de Eluição	Agrotóxico	$t_R$ / min	MM / g mol <sup>-1</sup>
1	Clorpirifós	4,66	350,89
2	Bifentrina	6,93	422,88
3	$\lambda$ -cialotrina	7,74	449,85
4	Deltametrina	10,2	505,20

A eluição dos agrotóxicos em um cromatógrafo a gás depende de suas interações com a coluna. Nota-se que quanto maior o valor de massa molar maior foi o tempo de retenção. Relacionado-se estes dois parâmetros,  $t_R$  x MM, pode-se observar (Figura 7), que houve uma boa correlação entre a massa molar e o tempo de retenção dos quatro agrotóxicos em estudo, com um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,9895. No entanto é importante ressaltar que esse comportamento é esperado, principalmente, quando se trata de séries homólogas. Possivelmente essa tendência ocorre, pois três dos quatro agrotóxicos estudados são do mesmo grupo químico (piretróides).

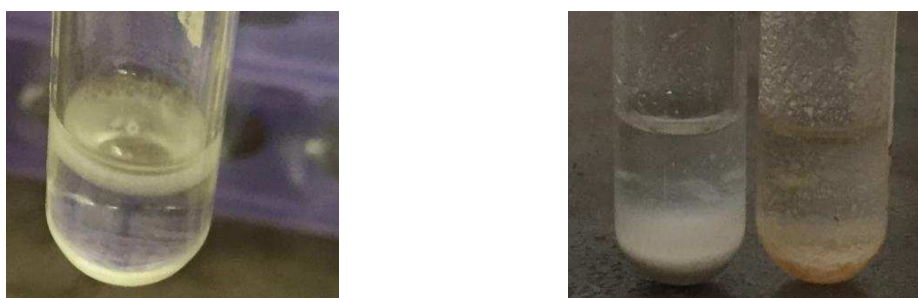


**Figura 7.** Correlação entre a massa molar e o tempo de retenção dos quatro agrotóxicos em estudo (clorpirifós, binfentrina,  $\lambda$ -cialotrina e deltametrina).

É possível também observar no cromatograma a presença de picos duplos para os piretróides  $\lambda$ -cialotrina e deltametrina. Este fenômeno está relacionado com a conversão destes compostos em isômeros durante a injeção de soluções de alguns piretróides no cromatógrafo a gás (MASTOVSKA *et al.*, 2004). Por isso, a quantificação deles foi realizada integrando a área dos dois picos juntos.

## 5.2. Otimização da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT)

Nos estudos preliminares, foram testadas outras técnicas de extração como a microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD) e a microextração em fase sólida (MEFS), além da ELL-PBT. Esses testes inicialmente foram feitos com água fortificada, e notou-se que a MEFS não se adequava, pois nas condições testadas os analitos não volatilizavam de forma adequada. Após esse pré-teste as outras duas técnicas (ELL-PBT e MELLD) foram aplicadas em amostras de soro fetal bovino e notou-se a importância de desenvolver um método capaz de remover compostos da matriz que são incompatíveis com técnica de análise instrumental. Durante esses testes, em alguns ensaios, houve a precipitação de proteínas (Figura 8) devido à adição de solventes orgânicos as amostras de soro sanguíneo, dificultando a recuperação do extrato. Polso *et al.*, 2003 afirmaram que os solventes orgânicos causam a redução do poder de solvatação da água, fortalecendo as interações eletrostáticas (proteína-proteína) e, com isso, as proteínas precipitam.



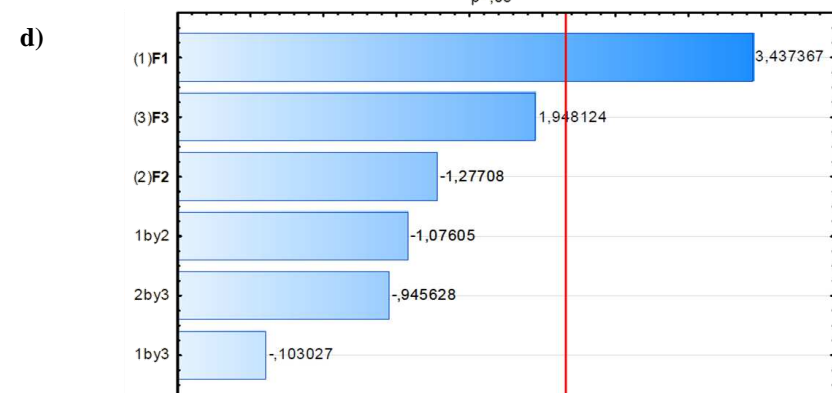
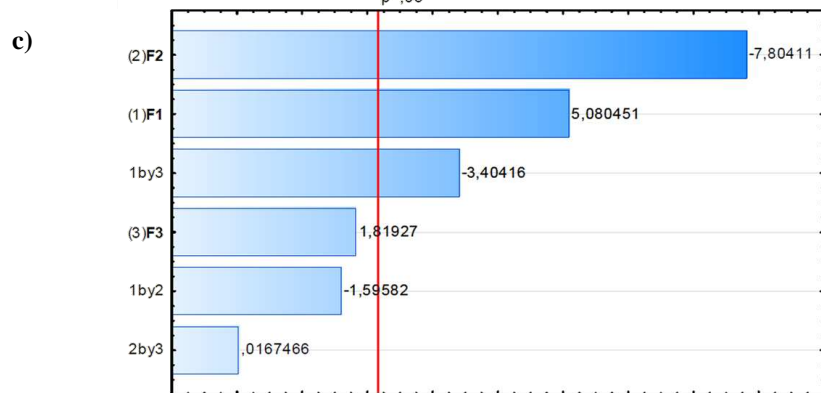
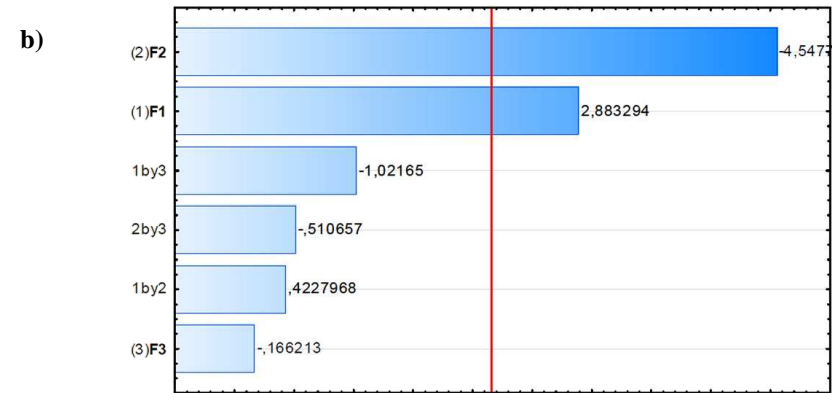
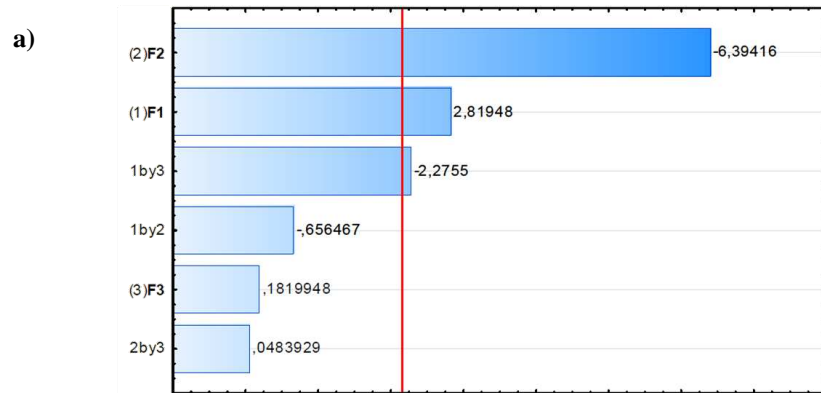
**Figura 8.** Fotos dos testes preliminares, onde é possível observar a precipitação de proteínas: a) DLLME e b) a ELL/PBT com a precipitação de proteínas por adição de solventes orgânicos na presença e ausência de sais neutros.

Tendo em vista que uma das principais características da técnica de ELL/PBT

é extrair os analitos de interesse e fazer o *clean-up* das amostras em uma única etapa, optou-se por adaptar essa técnica para extrair resíduos de agrotóxicos de soro sanguíneo. Para isso, os seguintes parâmetros: volume de água adicionada, volume de solvente extrator e tempo de agitação foram otimizados.

Os três parâmetros, volume de água adicionada, volume de solvente extrator e tempo de agitação, foram escolhidos com o objetivo de promover o *clean-up* - evitando a precipitação das proteínas – e de promover maior eficiência de extração. A otimização destes fatores foi feita através de um planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central e a significância de cada fator foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) usando níveis de significância p-valor.

A concentração dos agrotóxicos no extrato de cada ensaio, determinada experimentalmente foi empregada para avaliar os resultados e gerar os gráficos de Pareto dos efeitos e interações. Esses gráficos foram gerados para cada um dos agrotóxicos isoladamente, como pode ser visto na Figura 9. Nestes gráficos o comprimento das barras permite comparar a significância de cada um dos efeitos e de suas interações.



**F1:** Volume de água      **F2:** Volume de Acetonitrila      **F3:** Tempo de agitação

**Figura 9.** Superfície de respostas envolvendo os fatores volume de Água (F1) e o tempo de agitação (F3), de um planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central ( $n=2$ ), tendo a concentração como resposta. Sendo: (a) clorpirifós, (b) bifentrina, (c)  $\lambda$ -cialotrina e (d) deltametrina.

---

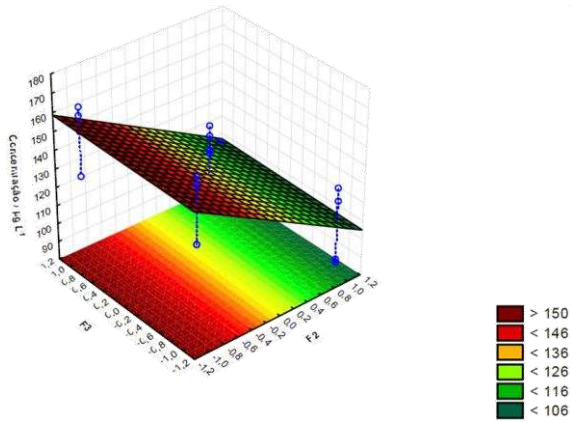
A partir dos gráficos de Pareto, foi possível observar que o volume de água adicionado (F1) e o volume de acetonitrila (F2) influenciaram na extração de clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina, os 3 primeiros compostos a eluir. O volume de acetonitrila teve influência negativa na extração destes analitos e o volume de água adicionado tem significância positiva. Esses resultados mostram que ao aumentar o volume de água e diminuir o de solvente extrator é possível obter resultados mais satisfatórios, melhorando a extração dos analitos. Provavelmente isso ocorre devido à interferência de proteínas, que tendem a precipitar mais com o aumento do volume de acetonitrila e redução do volume de água. A presença de solventes orgânicos diminui a constante dielétrica ( $\epsilon$ ) das amostras de soro, os solventes deslocam as moléculas de água que rodeiam a região hidrofóbica na superfície das proteínas, minimizando essas interações hidrofóbicas (água-proteína) e aumentando as interações eletrostáticas (proteína-proteína) – causando sua precipitação (FRANCISCO et al., 2006; POLSON et al., 2003). Essas ligações proteína-proteína causam a sua precipitação e conseqüentemente o arraste dos analitos por coprecipitação, reduzindo a eficiência de extração do método. Com isso, o aumento do volume de água e a diminuição do volume de acetonitrila evita essa interação entre as moléculas de proteína, o que torna os analitos mais disponíveis para extração.

O tempo de agitação (F3) não foi significativo para nenhum dos agrotóxicos em estudo no intervalo avaliado. No entanto, observa-se que a interação entre este parâmetro (F3) e o volume de água adicionado (F1) foi significativa de maneira negativa para o clorpirifós e a  $\lambda$ -cialotrina, Assim, ao se empregar maiores volumes de água, deve-se agitar a mistura por menor tempo. Esta interação entre (F1) e (F3) não influenciou significativamente a extração dos demais agrotóxicos.

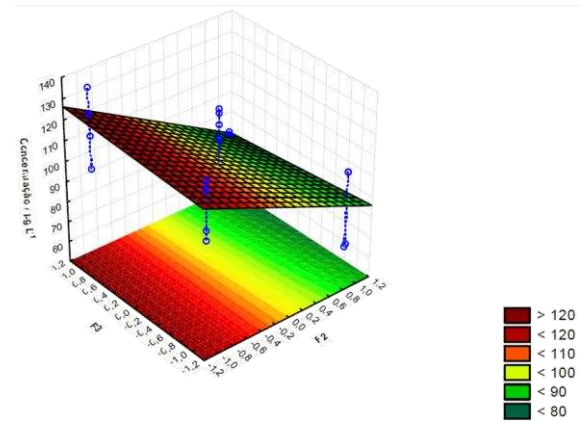
A deltametrina, último composto a eluir, apresentou comportamento diferente dos outros agrotóxicos. Somente o volume de água adicionada (F1) influenciou significativamente e de maneira positiva a extração deste analito, logo maior volume de água melhoraria a eficiência da extração.

As interações entre os fatores podem ser melhor visualizadas pelas superfícies de respostas, que estão apresentadas nas Figuras 10, 11 e 12.

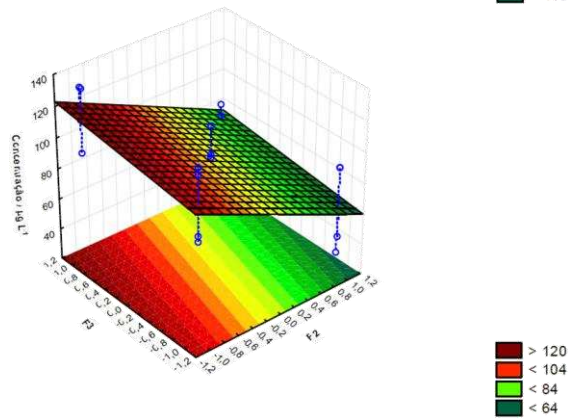
a)



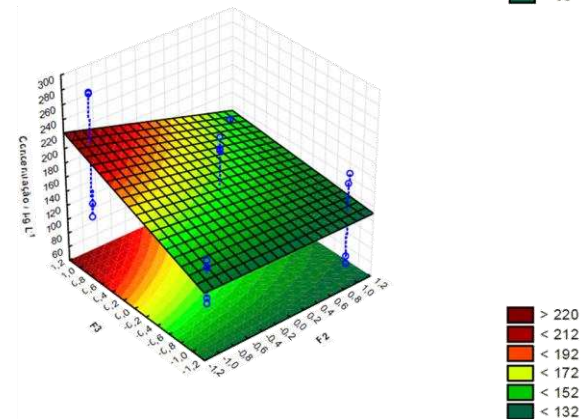
b)



c)

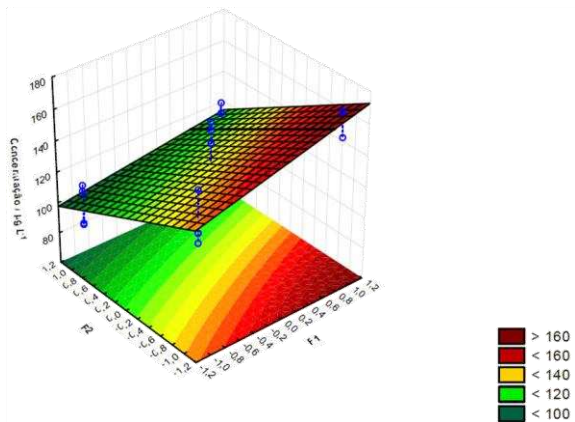


d)

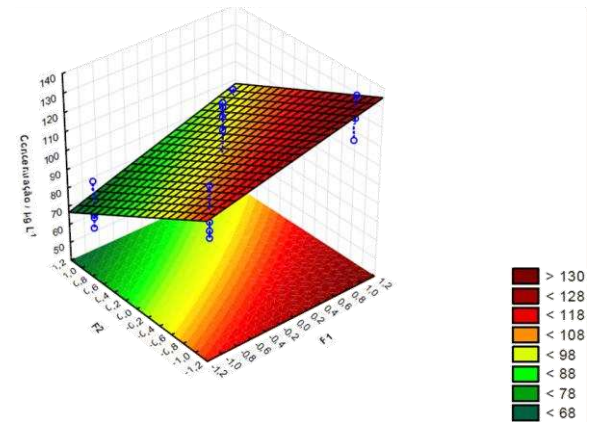


**Figura 10.** Superfície de respostas envolvendo os fatores volume de Acetonitrila (F2) e o tempo de agitação (F3), de um planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central ( $n=2$ ), tendo a concentração como resposta. Sendo: (a) clorpirifós, (b) bifentrina, (c)  $\lambda$ -cialotrina e (d) deltametrina.

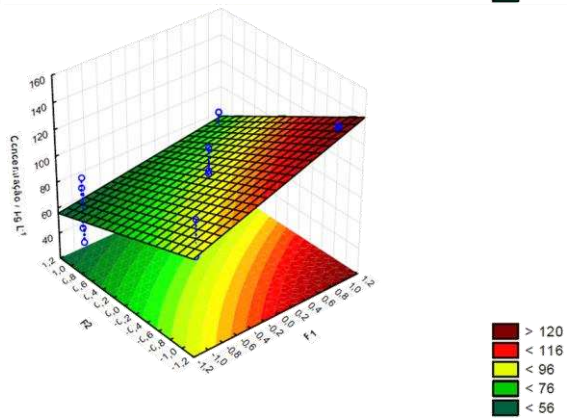
a)



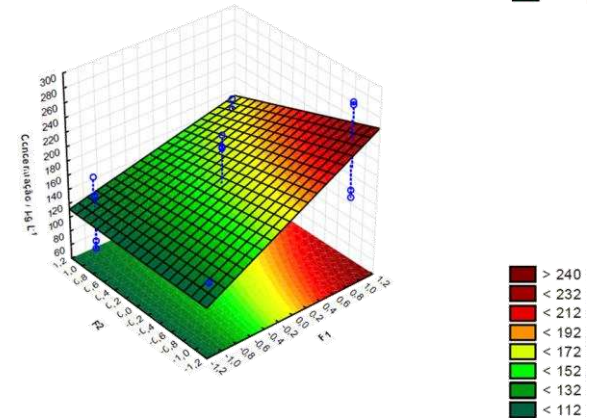
b)



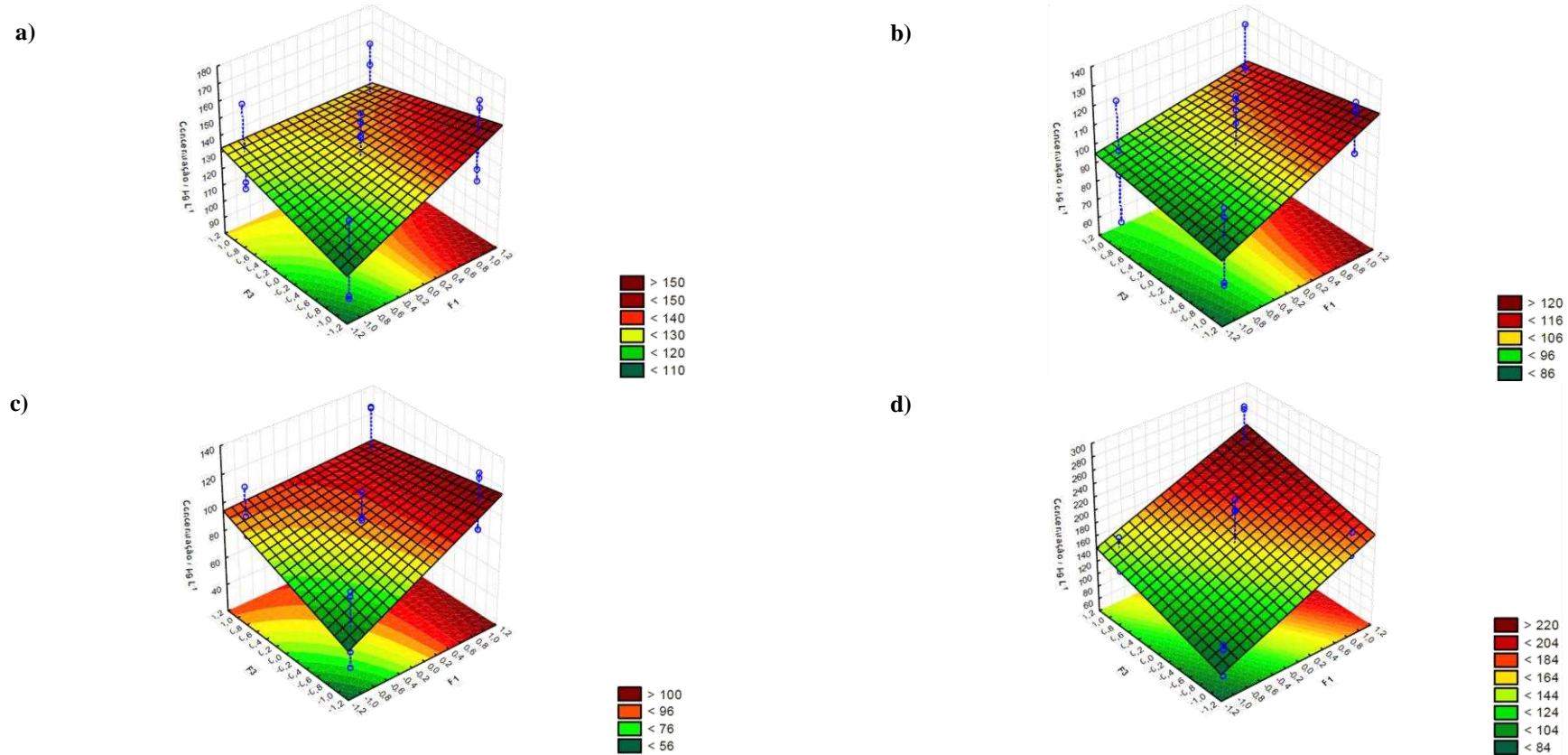
c)



d)



**Figura 11.** Superfície de respostas envolvendo os fatores volume de água (F1) e volume de Acetonitrila (F2), de um planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central ( $n=2$ ), tendo a concentração como resposta. Sendo: (a) clorpirifós, (b) bifentrina, (c)  $\lambda$ -cialotrina e (d) deltametrina.



**Figura 12.** Superfície de respostas envolvendo os fatores volume de Água (F1) e o tempo de agitação (F3), de um planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central ( $n=2$ ), tendo a concentração como resposta. Sendo: (a) clorpirifós, (b) bifentrina, (c)  $\lambda$ -cialotrina e (d) deltametrina.

---

Como o objetivo deste trabalho era desenvolver um método que promovesse o *clean-up* da amostra, minimizando a interferência da proteína e melhorando a recuperação dos analitos, optou-se por avaliar, além dos parâmetros já discutidos, o fator de enriquecimento obtido em cada ensaio.

O fator de enriquecimento (FE) foi calculado segundo a Equação 6.

$$FE = \frac{C_f}{C_i} \quad (\text{Equação 6})$$

Sendo:

$C_f$  = concentração obtida no extrato

$C_i$  = concentração em que a amostra foi fortificada

Os resultados obtidos para cada ensaio estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Fator de enriquecimento que cada experimento do planejamento experimental

	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>E5</b>	<b>E6</b>	<b>E7</b>	<b>E8</b>	<b>E9</b>	<b>E10</b>
<b>Clor.</b>	2,66	3,31	2,85	1,74	2,00	2,24	2,85	1,87	2,49	2,69
<b>Bif.</b>	2,06	2,52	2,20	1,30	1,48	1,80	2,20	1,51	2,09	2,13
<b><math>\lambda</math>-Cial.</b>	1,72	2,56	2,03	0,79	2,03	2,26	3,33	1,72	2,47	2,95
<b>Delt</b>	1,02	1,53	1,15	0,62	2,01	2,46	3,83	1,95	1,62	1,69

E = experimento; E9 e E10 são os pontos centrais do planejamento experimental.

O ensaio 7 foi o que apresentou uma melhor eficiência para todos os agrotóxicos estudados, sendo observada melhoria acentuada principalmente nas respostas dos últimos compostos a eluir. Neste ensaio foram utilizados 1000  $\mu$ L de água, 500  $\mu$ L de acetonitrila e tempo de agitação de 60 s. Este resultado está em concordância com os apresentados nos Diagramas de Pareto, em que a adição de maior volume de água e a redução do volume de acetonitrila maximizam a eficiência da técnica, corroborando assim, com a escolha feita.

---

### **5.3. Método de microextração em única etapa e análise por cromatografia gasosa**

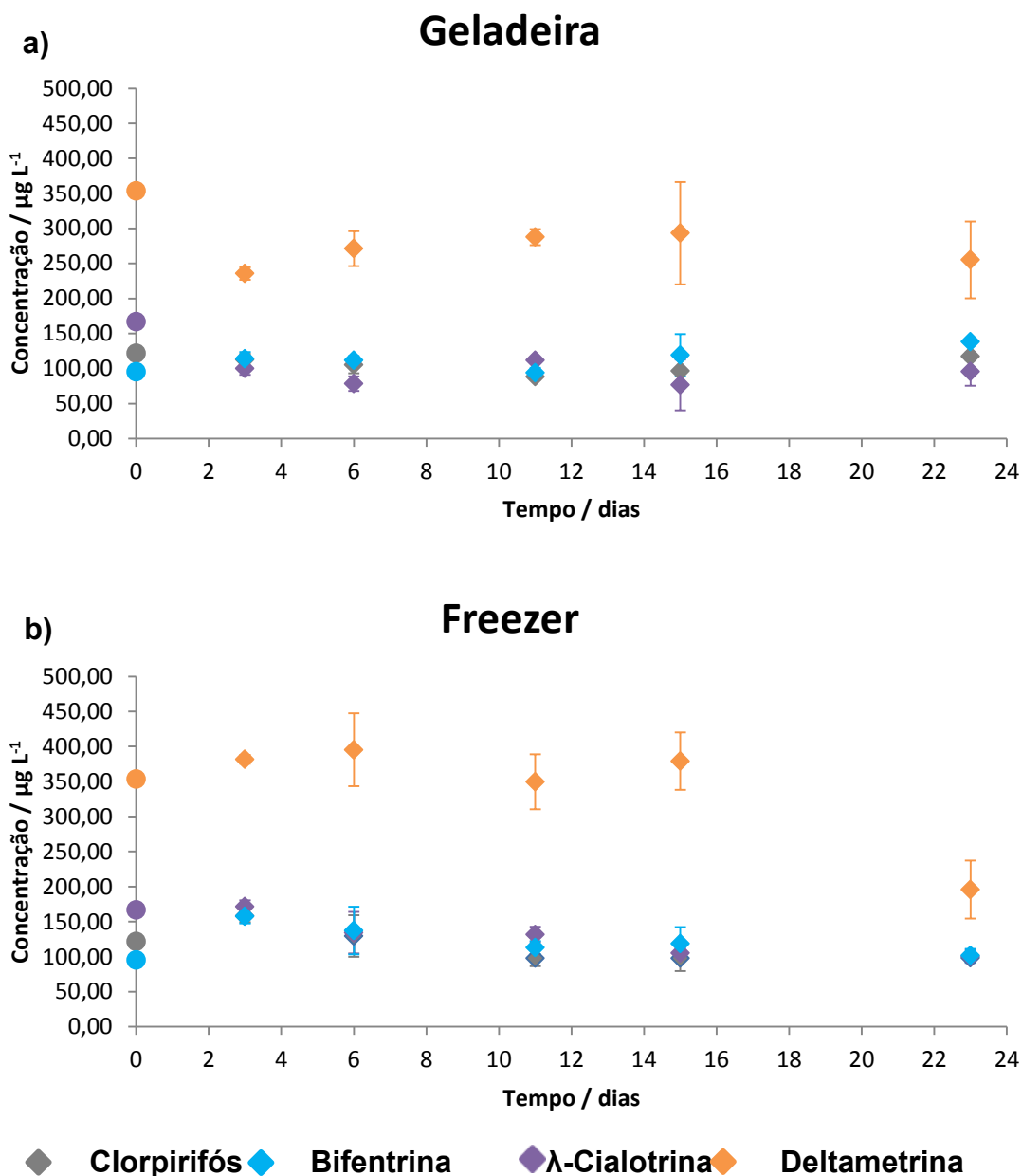
O método otimizado consiste na adição de 1000 µL de água e 500 µL de acetonitrila a 500 µL de soro sanguíneo, seguida de agitação em vórtex por 1 min à temperatura ambiente. Em seguida as amostras são deixadas em freezer a aproximadamente -20 °C por cerca de 12 horas. Após separação das fases, o extrato é recuperado, retirando-se aproximadamente 100 µL, que é colocado direto em um frasco de análise (*vial*) contendo um insert e analisado por cromatografia gasosa.

O método desenvolvido requer um pequeno volume de solvente extrator e não necessita de mais etapas para melhorar o fator de enriquecimento. Com isso, há uma redução no risco de contaminação e perdas de analitos. Trabalhos como os de FERNÁNDEZ *et al.*, 2015 e TARAZONA *et al.*, 2013 utilizam volume de amostra igual ou próximo ao proposto, no entanto requerem uma etapa de *clean-up* (precipitação de proteínas), o que torna o método proposto mais vantajoso.

### **5.4. Estudo da estabilidade do analito na matriz**

Estudos de estabilidade dos analitos na matriz biológica são importantes para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos, pois mudanças nas condições experimentais e/ou uma longa janela de tempo, entre a amostragem e a análise química, podem causar mudanças na estrutura química ou na concentração dos compostos em estudo. Além disto, esses estudos permitem gerar informações sobre o tempo de armazenamento da amostra antes da análise sem perda de confiabilidade nos resultados gerados. Neste trabalho estabilidade da amostra foi avaliada ao longo de 23 dias.

Amostras de soro fetal bovino fortificadas com os agrotóxicos foram armazenadas em duas condições distintas: freezer a -20 °C e geladeira a aproximadamente 4 °C. Os resultados obtidos para o comportamento dos analitos nessas situações estão apresentados na Figura 13.



**Figura 13.** Estudo de estabilidade dos analitos. a) Comportamento dos analitos na amostra armazenada em geladeira e b) Comportamento dos analitos na amostra armazenada em freezer.

Nos gráficos a e b da **Figura 13** foi possível observar que em geral não houve grandes variações de concentração neste período de tempo, o que demonstra a estabilidade dos analitos na geladeira e no freezer.

Ao comparar os resultados obtidos na **Figura 13 a e b**, pode-se notar que há uma pequena diferença entre as concentrações. Houve uma maior recuperação nas amostras conservadas em freezer, possivelmente isso ocorreu devido à precipitação

---

de proteínas presentes nas amostras que ficaram na geladeira (Figura 14). Nessas condições a matriz está em uma maior temperatura (4 °C) e no estado líquido, o que possibilita um enfraquecimento das ligações de hidrogênio que existem entre as proteínas e a água presente na matriz. Com isso, há a precipitação das proteínas e um arraste dos analitos de interesse.



**Figura 14.** Fotos de amostras de soro fetal bovino, na temperatura ambiente, no 23° dia do estudo de estabilidade da matriz. Sendo que o frasco da esquerda foi armazenado no freezer e o da direita na geladeira.

## 5.5. Validação do método analítico

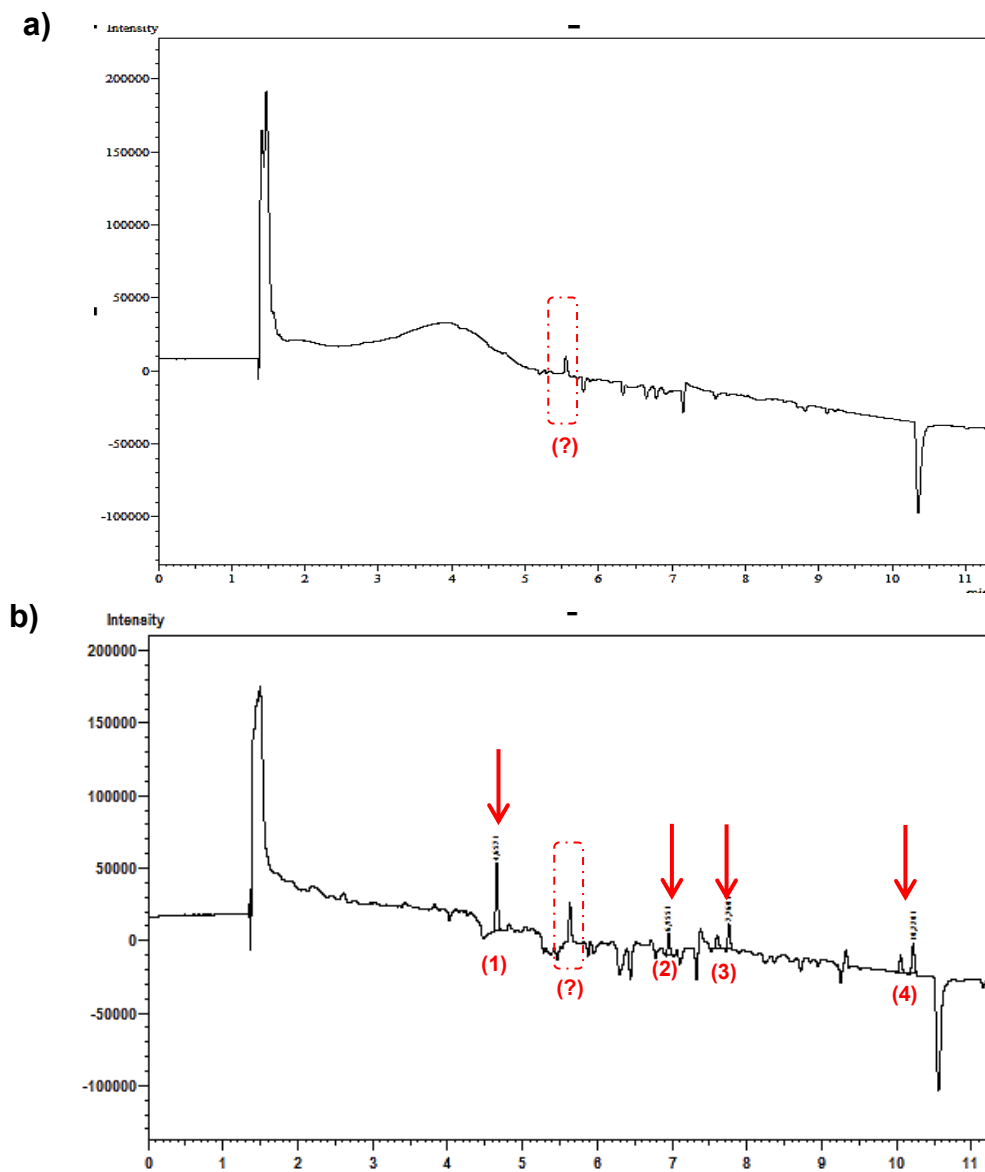
Para assegurar que o método analítico proposto é adequado para identificar e quantificar os analitos, parâmetros como seletividade, limite de detecção e quantificação, linearidade, exatidão e precisão foram determinados, seguindo as recomendações de CASSIANO *et al.*, 2009; RIBANI *et al.*, 2004 e ANVISA (2003).

### 5.5.1. Seletividade

O estudo deste parâmetro consiste em aplicar o método em uma matriz isenta dos analitos de interesse, para avaliar a presença de interferentes (CASSIANO *et al.*, 2009). Nas análises instrumentais das amostras feitas em cromatógrafos a seletividade deve garantir que no tempo de retenção do analito, o pico de resposta seja exclusivamente deste e não de interferentes da amostra (PASCHOAL *et al.*, 2008).

Para o estudo de seletividade, o método proposto foi aplicado em amostras de soro sanguíneo isentas dos analitos de interesse e nestas fortificadas com estes analitos. Os resultados da Figura 15 mostram os cromatogramas dos extratos

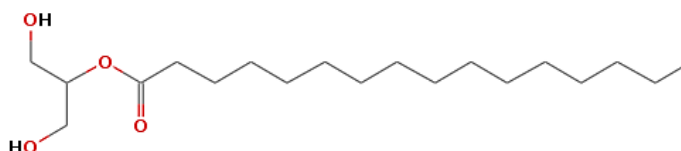
obtidos para a amostra isenta dos agrotóxicos (Figura 15a) e para a amostra fortificada com os analitos de interesse (Figura 15b).



**Figura 15.** Cromatograma, obtidos através do CG/DEC, de extrato das amostras de soro bovino fetal a) isenta dos analitos; b) contendo  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina e  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  deltametrina: (1) clorpirifós:  $t_R = 4,66 \text{ min}$ ; (2) bifentrina:  $t_R = 6,93 \text{ min}$ ; (3)  $\lambda$ -cialotrina:  $t_R = 7,74 \text{ min}$  e (4) deltametrina:  $t_R = 10,2 \text{ min}$ .

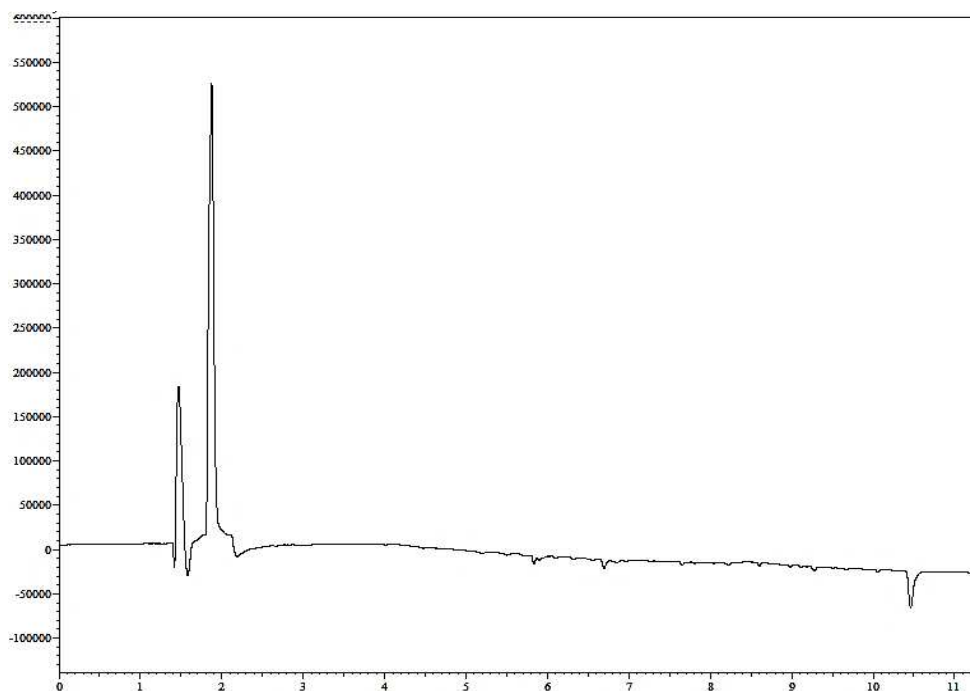
Ao avaliar o cromatograma do extrato isento dos analitos (branco) é possível notar a ausência de picos no mesmo tempo de retenção que os compostos em estudo, o que demonstra a seletividade do método. Também é possível notar a presença do pico de um composto, marcado com uma (?) nos cromatogramas, no

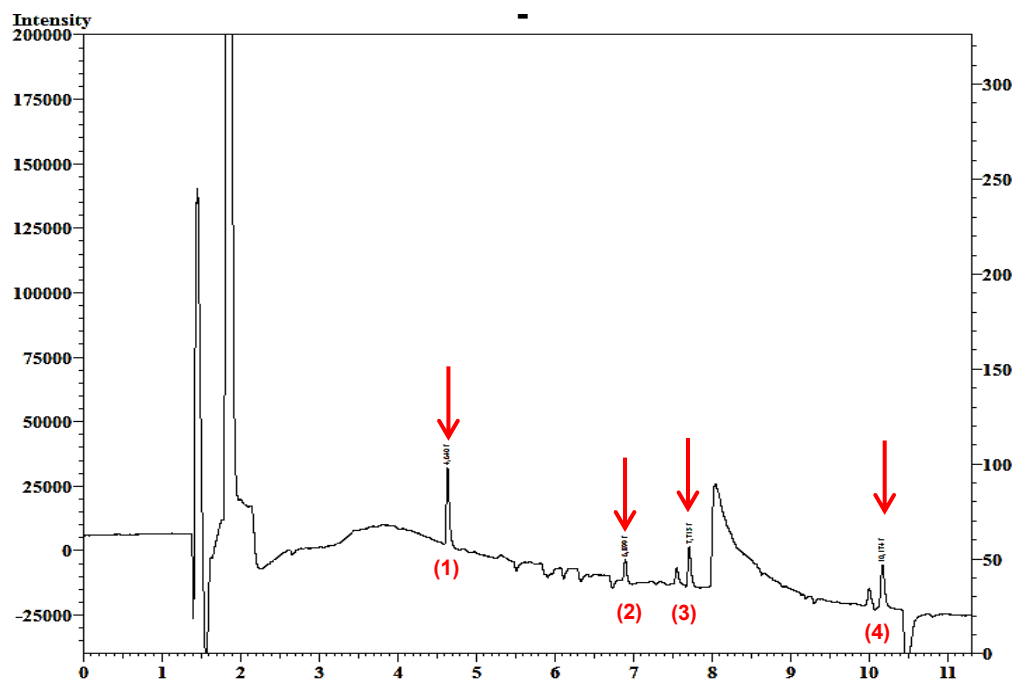
$t_R = 5,5$  min, sendo que este não co-elui com os analitos de interesse. Esse pico foi caracterizado através de espectrometria de massas que gerou informações estruturais e a possível massa molar do composto. Este composto de massa molar igual 330,50 g/mol foi identificado como o glicerol 2-palmitato ou ácido hexadecanol, 2-hidroxi-1-(hidroximetil)etil éster (Figura 16).



**Figura 16.** Estrutura química do glicerol 2-palmitato

O método otimizado e validado para soro fetal bovino foi aplicado em amostras de soro sanguíneo humano a fim de avaliar se os compostos dessa matriz iriam interferir na análise. Não foi observado nenhum pico nos tempos de retenção dos compostos de interesse, não sendo observado também a presença do glicerol 2-palmitato no cromatograma dos extratos de soro sanguíneo humano. Assim como pode ser observado na Figura 17, que mostra os cromatogramas dos extratos obtidos para a amostra isenta dos agrotóxicos (Figura 17a) e para a amostra fortificada com os analitos de interesse (Figura 17b).





**Figura 17.** Cromatograma de extrato das amostras de soro sanguíneo humano a) isenta dos analitos; b) contendo  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina e  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  deltametrina: (1) clorpirifós:  $t_R = 4,66 \text{ min}$ ; (2) bifentrina:  $t_R = 6,93 \text{ min}$ ; (3)  $\lambda$ -cialotrina:  $t_R = 7,74 \text{ min}$  e (4) deltametrina:  $t_R = 10,2 \text{ min}$ .

Esses cromatogramas foram obtidos para amostras de soro sanguíneo humano, com o objetivo de avaliar a seletividade do método ao aplicá-lo em amostras humanas. E foi possível notar na Figura 17 que não há de picos no mesmo tempo de retenção que os analitos, indicando que o método é seletivo nessa matriz assim como para o soro sanguíneo bovino. Nesta figura também foi possível notar a ausência do interferente que o soro bovino fetal (Figura 16).

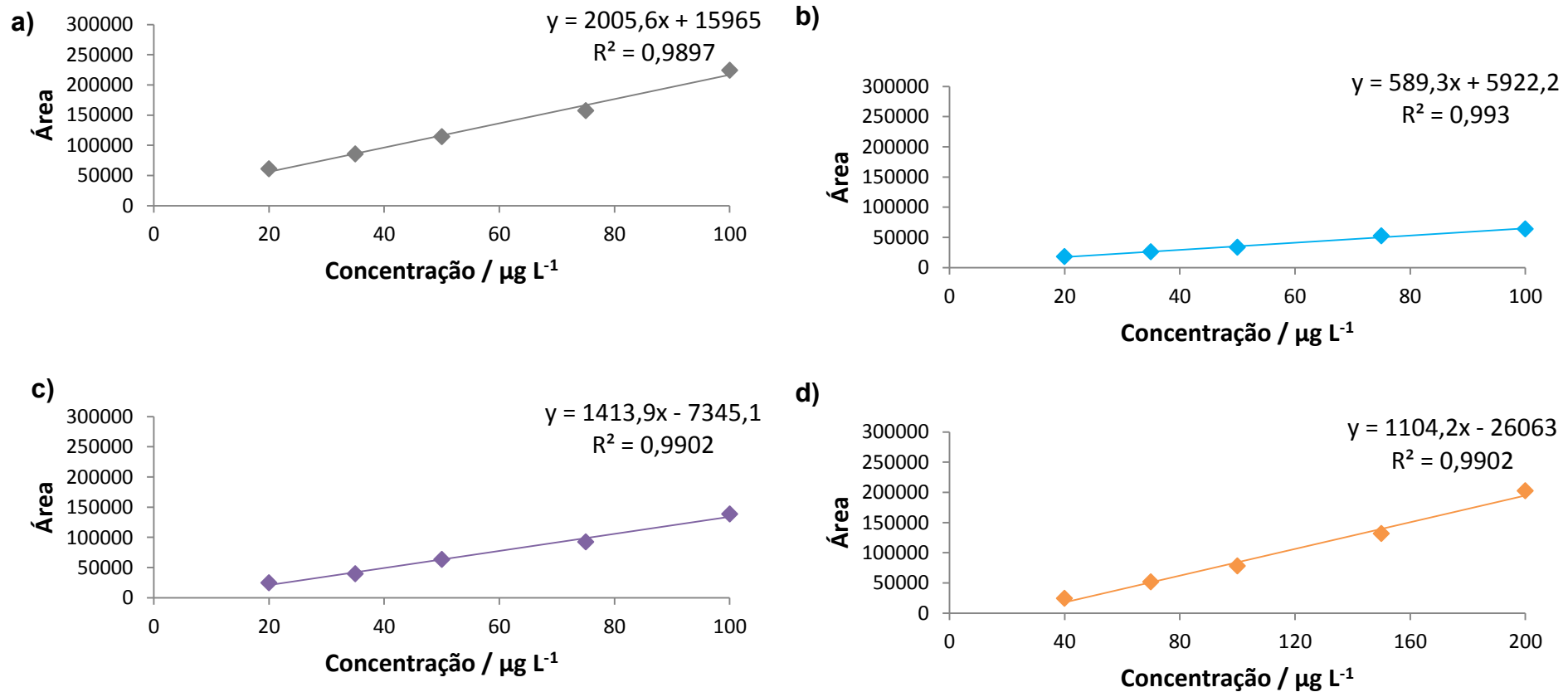
### 5.5.2. Linearidade de resposta do método

A capacidade do método em fornecer um resultado diretamente proporcional à concentração do analito corresponde à linearidade. Esse parâmetro está restrito a uma faixa de concentração e pode ser expresso por uma equação de reta (curva analítica), onde o coeficiente de correlação estima a sua qualidade. (RIBANI *et al*, 2004). Quanto mais próximo de 1,00 for o valor do coeficiente de correlação, menor será a dispersão dos dados experimentais e a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A ANVISA (2003) estabelece que um valor de coeficiente de

---

correlação maior ou igual a 0,99 é aceitável para uma curva analítica com no mínimo 5 pontos.

O método, ELL-PBT-DCE otimizado foi aplicado em amostras de soro sanguíneo fortificadas nas concentrações 20, 35, 50, 75 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  para clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina e de 40, 70, 100, 150 e 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a deltametrina. A partir dos dados obtidos foram construídas curvas analíticas para cada um dos compostos e a linearidade destes avaliadas pelo método dos mínimos quadrados. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e as equações das curvas analíticas, obtidos para cada composto estão apresentados na Figura 18.



**Figura 18.** Curvas analíticas preparadas a partir de extratos de amostras de soro fetal bovino fortificadas com padrão dos analitos, em uma faixa de concentração de 20 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  para clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina e de 40 a 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a deltametrina, submetidas à ELL-PBT. O extrato foi analisado por CG/DCE. Sendo: (a) clorpirifós, (b) bifentrina, (c)  $\lambda$ -cialotrina e (d) deltametrina.

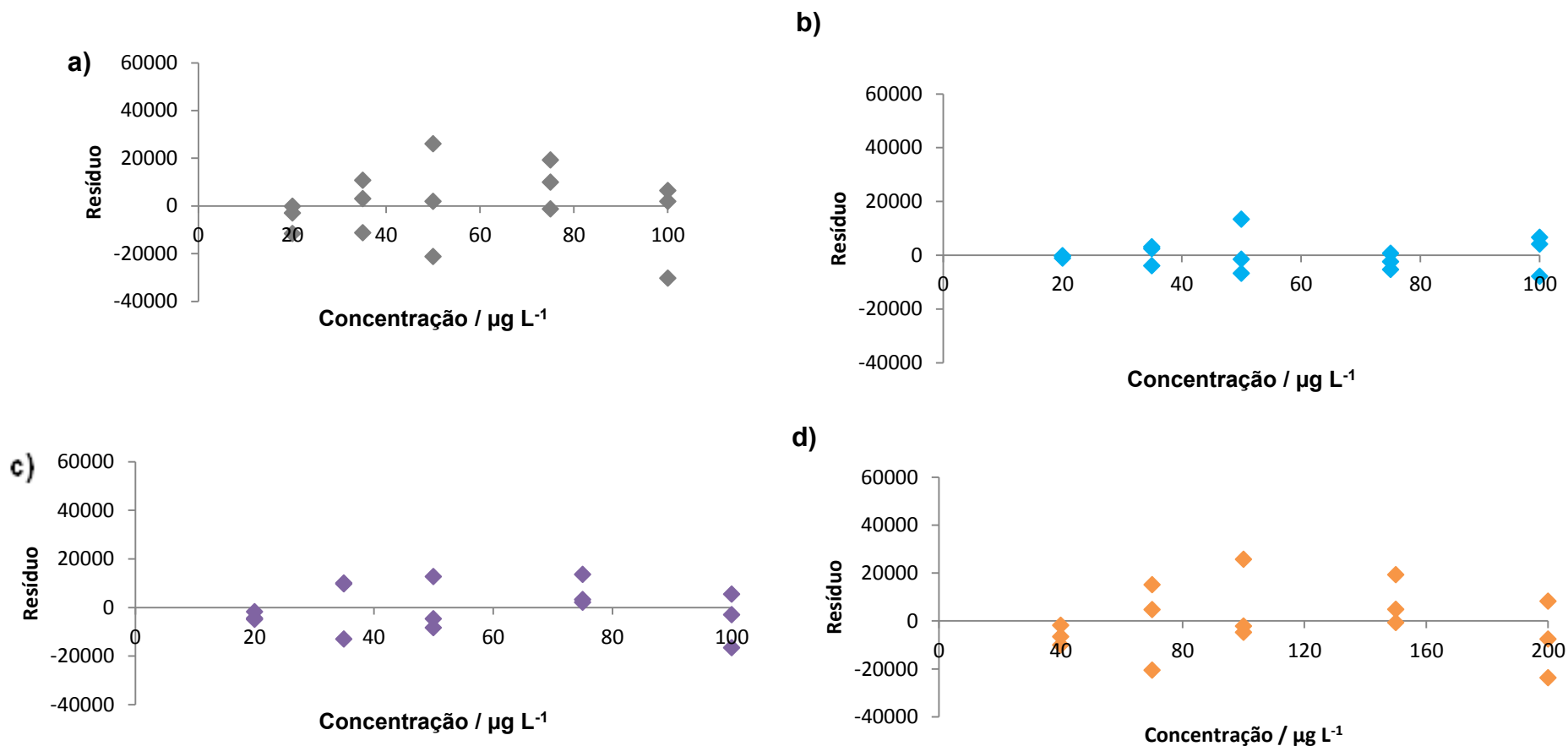
---

As equações da reta e os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) podem ser vistos na Tabela 7.

**Tabela 7.** Equações da reta e coeficientes de determinação do clorpirifós, bifentrina,  $\lambda$ -cialotrina e deltametrina

<b>Agrotóxico</b>	<b>Equação Linear</b>	<b>Coefficiente de determinação (<math>R^2</math>)</b>
Clorpirifós	$y = 2005,6x + 15965$	0,990
Bifentrina	$y = 589,3x + 5922,2$	0,993
$\lambda$ -cialotrina	$y = 1413,9x - 7345,1$	0,990
Deltametrina	$y = 1104,2x - 26063$	0,990

Com esses resultados é possível afirmar que a curvas analíticas obtidas pela superposição de matriz, mostraram-se lineares nessa faixa de concentração, pois o  $R^2$  foi maior que 0,98 conforme recomendações da ANVISA (2003). Além disso, foram avaliados os gráficos de resíduos obtidos a partir dos valores calculados pela curva analítica de cada agrotóxico (Figura 19). Os gráficos de resíduos dos agrotóxicos concentram-se em torno do zero e os pontos se distribuem aleatoriamente. Como não demonstram um padrão de distribuição pode-se dizer que a variância é constante e que a relação é linear. Isso indica que o modelo de regressão escolhido se ajustou adequadamente aos dados.



**Figura 19.** Gráficos de resíduos para as curvas analíticas das amostras de soro sanguíneo, em uma faixa de concentração de 20 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  para clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina e de 40 a 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a deltametrina, e analisados por CG/DCE. Sendo: (a) clorpirifós, (b) bifentrina, (c)  $\lambda$ -cialotrina e (d) deltametrina.

### 5.5.3. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) são definidos, respectivamente, como a menor quantidade do analito que pode ser detectada e a menor concentração da substância que pode ser quantificada com precisão adequada (CASSIANO *et al.*, 2009; THOMPSON *et al.*, 2002).

Conforme foi descrito no item 4.7.3, os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para cada um dos agrotóxicos foram determinados utilizando as equações 2 e 3, que consistem em múltiplos da razão entre o coeficiente angular da curva analítica de cada analito e o desvio da área do branco em seus respectivos tempo de retenção. Os valores de LD e LQ obtidos para cada um dos agrotóxicos estudados são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método para o clorpirifós, bifentrina,  $\lambda$ -cialotrina e deltametrina

<b>Agrotóxico</b>	<b>LD / <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>	<b>LQ / <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>
Clorpirifós	2,57	8,58
Bifentrina	3,73	12,4
$\lambda$ -cialotrina	5,10	17,0
Deltametrina	3,26	10,9

Os valores de LD e LQ obtidos para os analitos com o auxílio de um CG/DCE variaram de 2,57 a 5,10  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 8,58 a 17,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Nota-se que estes valores estão abaixo da CL50 (0,06 – 1,01  $\text{mg L}^{-1}$ ), que mede a intoxicação por inalação dos analitos (Tabela 3). Isso indica que o método proposto para determinação de resíduos de agrotóxicos em soro sanguíneo mostra-se apto para avaliar esse tipo de contaminação.

#### 5.5.4. Exatidão

A exatidão mede a concordância dos dados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor de referência, dito verdadeiro, que deve ser obtido por uma medição perfeita (RIBANI *et al.*, 2004).

A exatidão do método ELL/PBT-CG/DCE proposto neste trabalho foi feita através de ensaios de recuperação que seguiu as recomendações feitas pela ANVISA (2003). Os ensaios foram feitos em triplicata em três concentrações distintas. Sendo que as concentrações nas amostras de soro sanguíneo foram iguais a: 20; 50 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  de clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina e 40; 100 e 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  de deltametrina.

A porcentagem de recuperação (%R) e o coeficiente de variação (CV) obtido para extração de cada analito presentes nas amostras de soro sanguíneo estão apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação (CV) obtidos pela análise de amostras de soro fetal bovino fortificada em três níveis de concentração

Analitos	Concentração	CV	%R
	Nominal / $\mu\text{g L}^{-1}$		
Clorpirifós	20	3,32	115
	50	12,9	85,5
	100	11,0	78,7
Bifentrina	20	6,93	108
	50	13,6	83,2
	100	8,03	77,4
$\lambda$ -cialotrina	20	6,02	99,9
	50	17,5	100
	100	5,76	75,3
Deltametrina	40	8,42	108
	100	2,98	107
	200	14,0	81,6

---

Os resultados obtidos para a maioria dos experimentos de extração possuem uma recuperação entre (70-120%) dentro da faixa aceitável pela ANVISA (2003). O que demonstra que o método otimizado mostra-se capaz de obter resultados com boa concordância.

#### **5.5.5. Precisão**

A precisão mede o grau de dispersão entre os dados obtidos ao aplicar o método otimizado, em uma mesma amostra, diversas vezes. Para o Imetro (2010) o experimento deve ser feito com 7 replicatas de um mesmo ponto, já para a Anvisa (2003) são triplicatas de três diferentes concentrações . Esse parâmetro pode ser expresso através do desvio padrão (DV) ou coeficiente de variação (CV), também conhecido como desvio padrão relativo (RSD) (RIBANI *et al.*, 2004; THOMPSON *et al.*, 2002).

##### **5.5.5.1. Repetitividade**

A repetitividade mede a dispersão dos resultados obtidos pelo método otimizado em um curto intervalo de tempo, por isso, ela também é conhecida como precisão intra-dia (CASSIANO *et al.*, 2009; RIBANI *et al.*, 2004). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação (CV) obtida, para amostras de soro fetal bovino fortificadas em três níveis de concentração. Sendo estes ensaios intra-dia

<b>Analitos</b>	<b>Concentração Nomial / <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>	<b>CV</b>	<b>%R</b>
Clorpirifós	20	19,8	101
	50	8,97	98,8
	100	3,00	86,2
Bifentrina	20	15,0	103
	50	7,56	97,1
	100	3,50	84,0
$\lambda$ -cialotrina	20	11,5	99,2
	50	7,92	101
	100	4,36	89,5
Deltametrina	40	14,6	90,2
	100	12,5	110
	200	6,36	92,1

Os resultados obtidos mostram uma boa repetitividade dos dados, pois como as amostras são complexas são aceitáveis coeficientes de variação de até 20% (RIBANI *et al.*, 2004).

#### **5.5.5.2. Precisão intermediária**

A precisão intermediária avalia a repetibilidade inter-dia dos resultados quando as análises são feitas usando o mesmo método analítico no mesmo laboratório, também podendo ser feita por diferentes analistas e/ou em diferentes equipamentos (CASSIANO *et al.*, 2009).

A estimativa dessa precisão foi feita por meio da porcentagem de seus respectivos coeficientes de variação (CV) e os experimentos foram feitos como descrito no item 4.7.5.2. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação (CV) obtida, para amostras de soro fetal bovino fortificadas em três níveis de concentração. Sendo estes ensaios intra-dia obtidos após análise em dias diferentes

Analitos	Precisão Intermediária (n=3)		
	Concentração Nomial / $\mu\text{g L}^{-1}$	% CV	%R
Clorpirifós	20	12,1	107
	50	11,0	94,4
	100	11,8	77,1
Bifentrina	20	11,0	96,6
	50	16,9	94,0
	100	10,1	75,3
$\lambda$ -cialotrina	20	12,0	93,6
	50	14,5	110
	100	7,30	74,1
Deltametrina	40	14,8	94,9
	100	19,4	109
	200	14,4	84,1

Os resultados obtidos mostram uma boa precisão inter-dia dos dados, pois como as amostras são complexas são aceitáveis coeficientes de variação de até 20% e a recuperação estava entre 70-120% (RIBANI *et al.*, 2004).

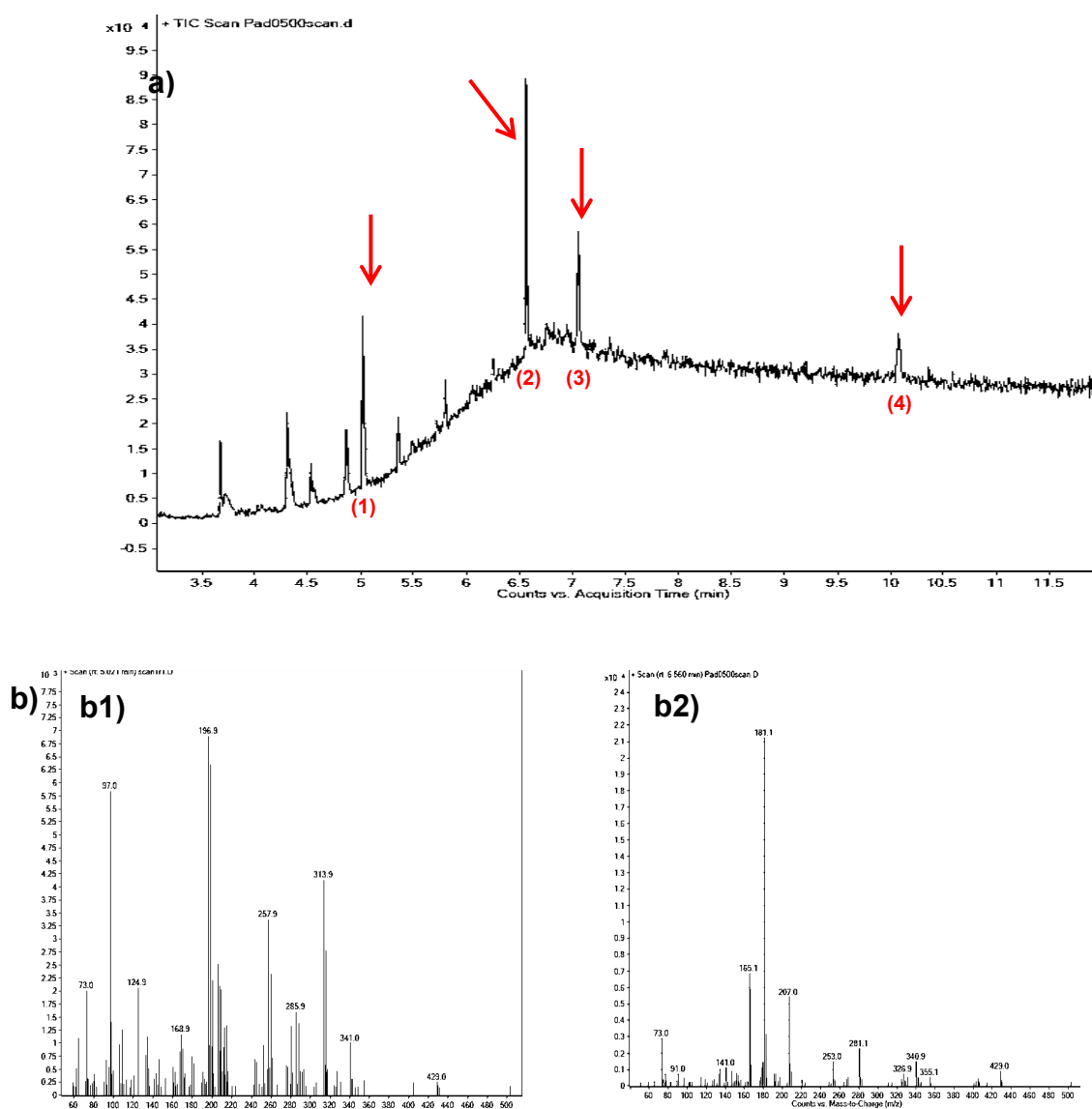
### 5.6. Análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM)

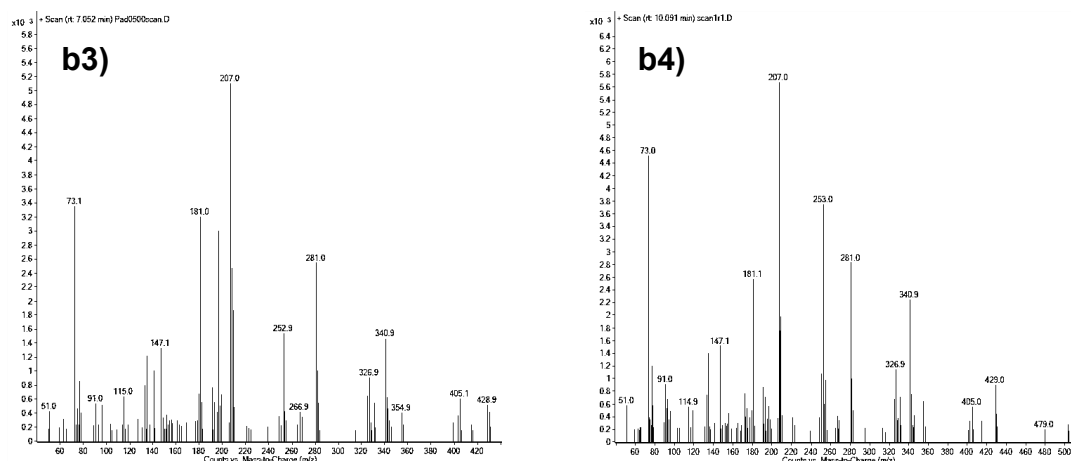
Apesar do CG/DCE fornecer dados com alto grau de confiança, para evitar falso positivo e garantir que os resultados encontrados para o soro sanguíneo humano fossem confiáveis, as amostras também foram analisadas por CG/EM.

Inicialmente uma solução padrão contendo clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina a  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  e deltametrina a  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  foram analisadas por CG/EM, visando determinar o tempo de retenção dos analitos e obter seus espectros de massa.

Foi obtido um cromatograma no modo SCAN ou TIC (total ion chromatogram - cromatograma de íons totais – Figura 20) e o tempo de retenção para cada composto (Tabela 12). Observam-se alguns interferentes no cromatograma, cujos picos são atribuídos, a compostos presentes em plásticos provavelmente devido ao contato do solvente extrator com ponteiras e as tampas de vials.

Com auxílio da biblioteca (NIST) do CG/EM foi possível identificar através do espectro de massas, os agrotóxicos estudados. Como foi empregada uma coluna contendo fase estacionária similar à empregada no CG/DCE, não houve mudança na ordem de eluição dos compostos, somente em alguns tempos de retenção. Os picos obtidos são simétricos apresentando boa resolução.



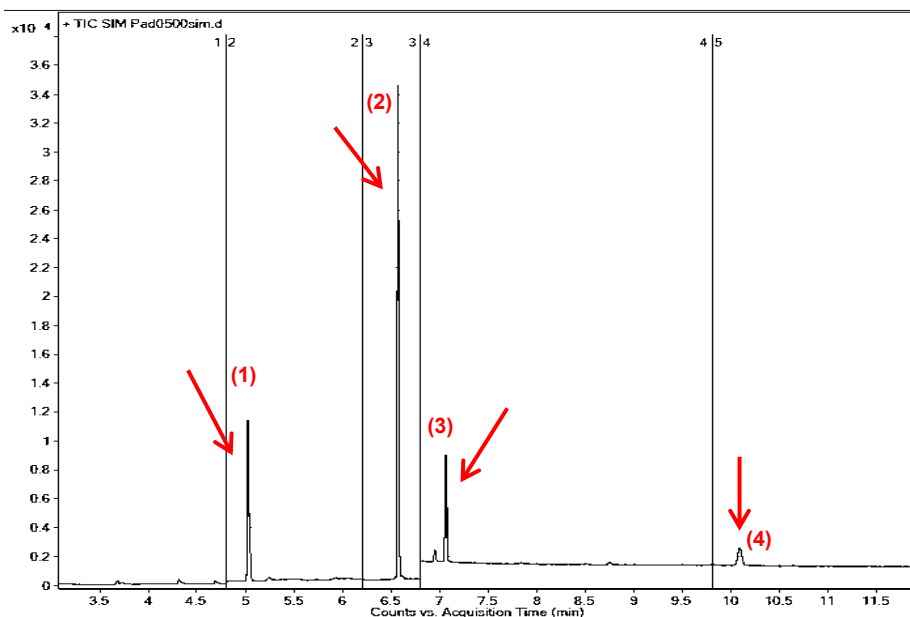


**Figura 20.** Cromatograma obtido por CG/EM de uma solução padrão de clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina a  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  e deltametrina a  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  em acetonitrila. Sendo: (a) análise no modo TIC. Em que (1)  $t_R = 5,02$  min: clorpirifós; (2)  $t_R = 6,62$  min: bifentrina; (3)  $t_R = 7,20$  min:  $\lambda$ -cialotrina; (4)  $t_R = 10,3$  min: deltametrina (b) Espectros de massas dos agrotóxicos. Sendo: (b1) clorpirifós, (b2) bifentrina, (b3)  $\lambda$ -cialotrina e (b4) deltametrina.

**Tabela 12.** Tempo de retenção dos agrotóxicos nas condições cromatográficas do CG/EM

Ordem de Eluição	Agrotóxico	$t_r$ / min
1	Clorpirifós	5,02
2	Bifentrina	6,62
3	$\lambda$ -cialotrina	7,20
4	Deltametrina	10,3

A partir do espectro de massas de cada composto foram selecionados os seguintes íons de razão  $m/z$ : 97, 197 e 199 para o clorpirifós, 165,166 e 181 para a bifentrina e 181,197 e 208 para a  $\lambda$ -cialotrina e deltametrina para obtenção do cromatograma no modo SIM (selected ions monitoring - monitoramento de íons selecionados). Foi estabelecida uma janela de tempo com 20 s antes e 20 s depois do tempo de retenção dos compostos (Figura 21).



**Figura 21.** Cromatogramas obtido por CG/EM no modo SIM de uma solução padrão com  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina e  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  deltametrina em acetoneitrila. Em que (1)  $t_R = 5,02$  min: clorpirifós; (2)  $t_R = 6,62$  min: bifentrina; (3)  $t_R = 7,20$  min:  $\lambda$ -cialotrina; (4)  $t_R = 10,3$  min: deltametrina.

O modo SIM, por fornecer um cromatograma mais limpo foi empregado para as análises quantitativas para determinar a concentração dos agrotóxicos estudados nas amostras de soro sanguíneo humano.

### 5.6.1. Comparação entre o soro fetal bovino e soro sanguíneo humano

O CG/MS também foi empregado para comparar as amostras de soro bovino e humano. Extratos dessas amostras foram injetados e a composição dessas avaliadas pelos seus cromatogramas. As amostras de soro fetal bovino e soro sanguíneo humano foram submetidas ao método de extração (ELL/PBT) otimizado e validado.

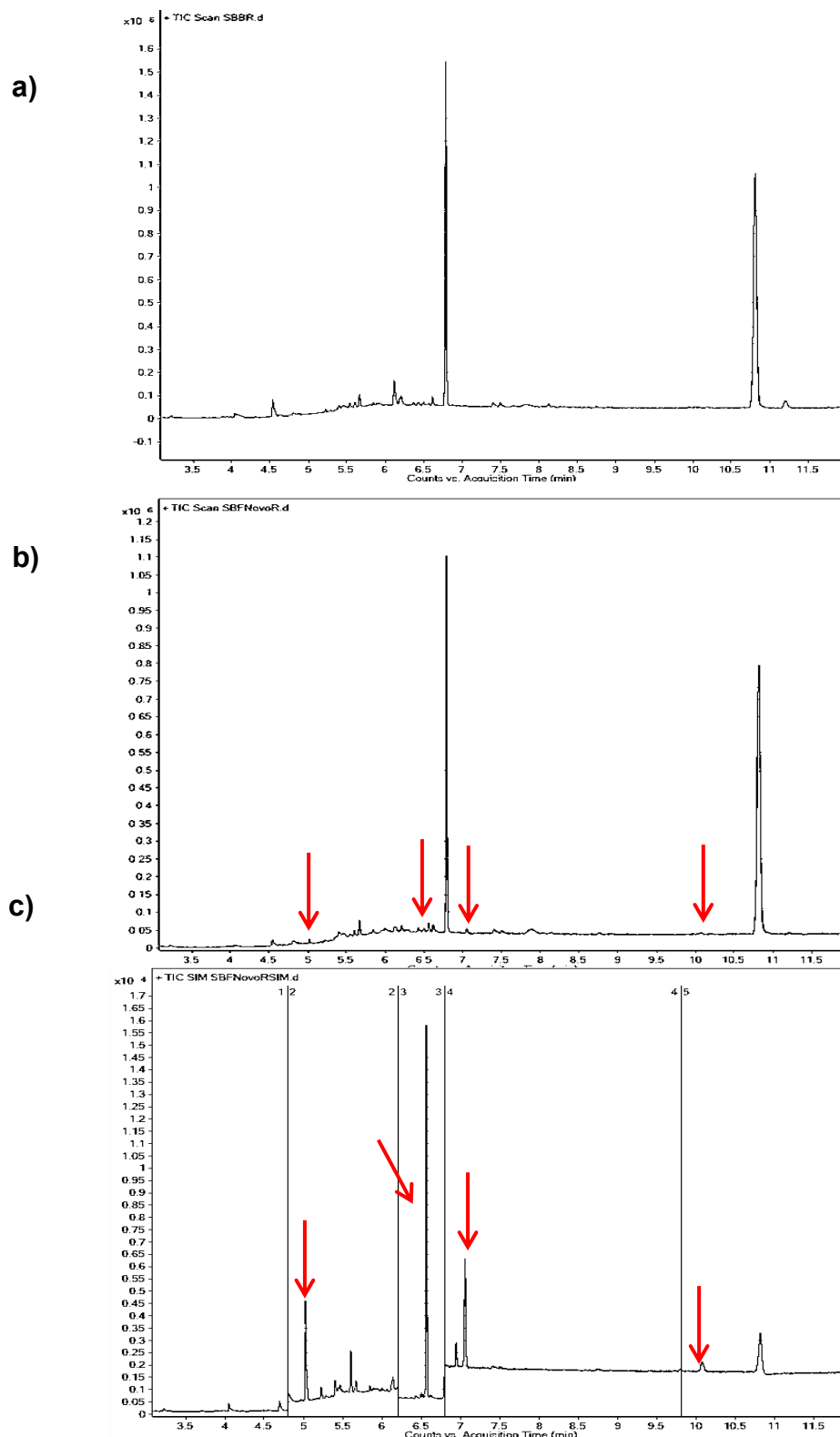
Este estudo foi necessário, uma vez que o método proposto foi otimizado e validado com amostras de soro bovino fetal, sendo necessário, portanto, avaliar se poderia ser empregado em amostras de soro humano. Para isso, os cromatogramas dos brancos e das amostras fortificadas foram comparados. Essa análise foi feita por CG/DCE (Figuras 15 e 17) e por CG/EM, no modo SIM e TIC (Figuras 22 e 23).

Assim como na Figura 15 nas Figuras 22a e 22b, no modo TIC, observa-se

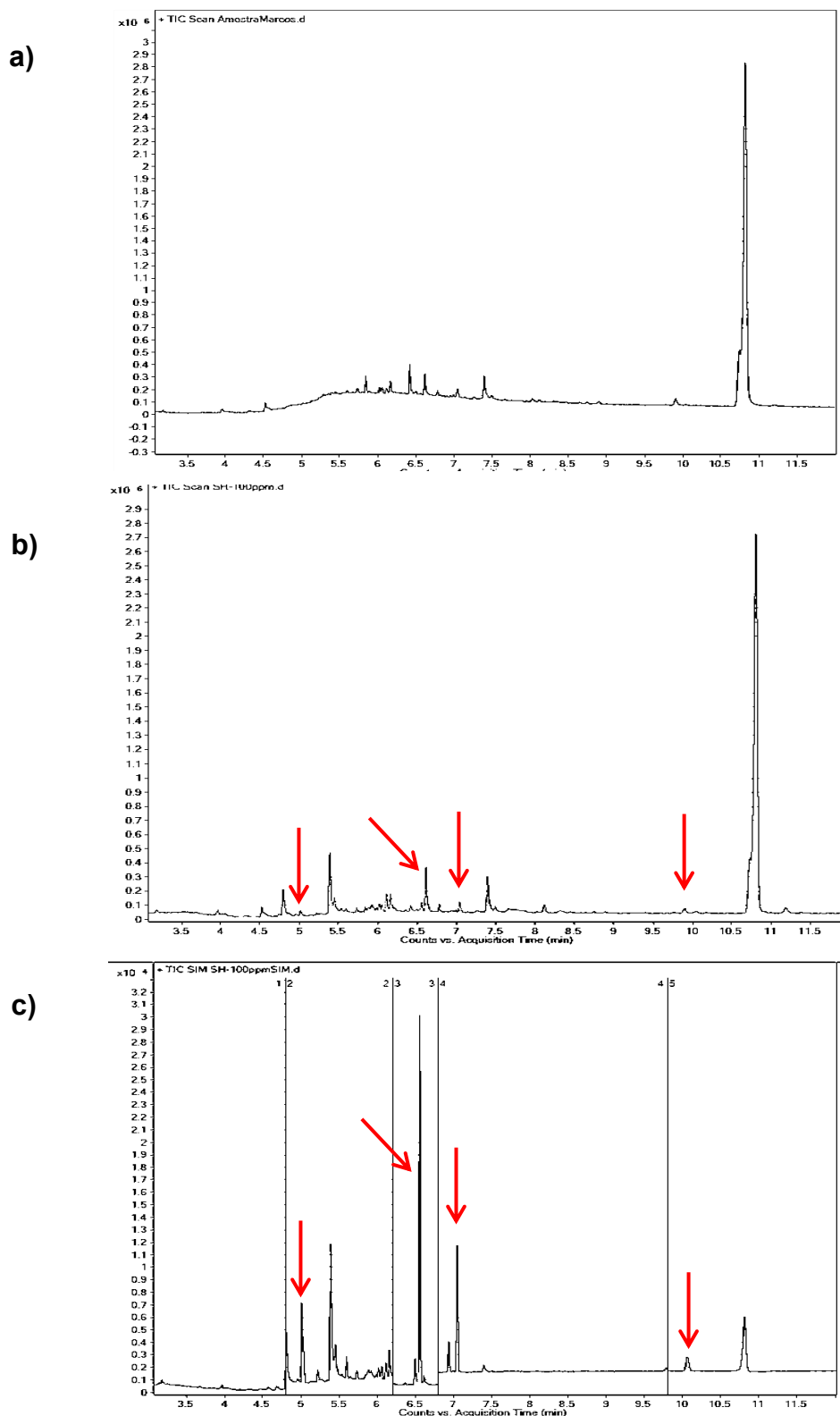
---

um pico no  $t_R$  igual a 5,58 e 6,74 min, respectivamente. Como comentado anteriormente este pico foi identificado como glicerol 2-palmitato, que é um composto característico do soro bovino e por isso está ausente nas amostras de soro sanguíneo humano, como pode ser observado nas Figuras 23a e 23b. No entanto, essa mesma substância não pode ser observada nos cromatogramas obtidos no modo SIM, independente da origem do soro sanguíneo. Esse monitoramento de íons torna a técnica de análise mais seletiva, o que causa a redução do sinal dos demais compostos.

Já na análise das amostras de soro humano feitas pelo CG/DCE (Figura 17) foi possível observar um pico logo após o do solvente extrator (acetonitrila), o primeiro a eluir. Em função do tempo de corte (3 min) da corrida necessário nas análises por CG/EM, este pico não pode ser identificado. Cabe ressaltar que este pico não estava presente nas amostras de soro bovino.



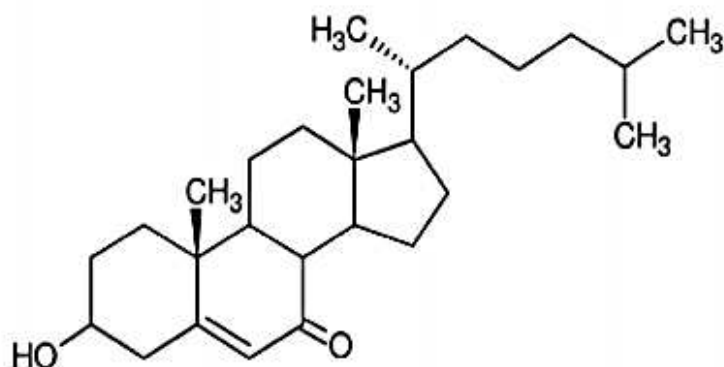
**Figura 22.** Cromatogramas obtidos no CG/EM para amostras de soro bovino fetal. Sendo: (a) amostra isenta de agrotóxicos no modo TIC, (b) amostra fortificada com  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina e  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  deltametrina no modo TIC e (c) amostra fortificada com  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina e  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  deltametrina no modo SIM.



**Figura 23.** Cromatogramas do CG/ME para amostras de soro humano. Sendo: (a) amostra isenta de agrotóxicos no modo TIC, (b) amostra fortificada com  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina e  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  deltametrina no modo TIC e (d) amostra fortificada com  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina e  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  deltametrina no modo SIM.

---

Um ponto em comum entre as duas amostras é a presença de um pico que elui aproximadamente em 10,8 min. Segundo a biblioteca do CG/EM, esse sinal corresponde à molécula de colesterol (Figura 24). Essa molécula imprescindível no organismo de muitos seres vivos, desde sua formação fetal até o fim da vida. Ela é precursora de hormônios esteróides e de ácidos biliares (NELSON e COX, 2009).



**Figura 24.** Estrutura química do Colesterol

Apesar de possuir em sua estrutura uma dupla ligação conjugada com um grupo cetona, a molécula de colesterol não pode ser observada no CG/DCE. Esse fato pode ser explicado pela insensibilidade do detector à presença do grupo cetona, hidrocarbonetos e álcoois (COLLINS *et al.*, 2006).

Com esse estudo foi possível verificar que as diferenças na composição do soro sanguíneo das duas espécies não afetaram a análise dos compostos de interesse. E que mesmo sendo otimizado e validado para amostras de soro sanguíneo humano o método mostrou-se capaz de identificar e quantificar os analitos. Além disso, independente da técnica instrumental de análise foi possível obter cromatogramas com boa resolução e picos simétricos. Sendo assim, acredita-se que o uso desse método em amostras humanas não trará grandes prejuízos, tornando essa uma boa aproximação.

---

### **5.6.2. Amostras de soro sanguíneo de agricultores da região de Coimbra**

O método otimizado e validado foi empregado para avaliar a presença dos agrotóxicos estudados em amostras de soro sanguíneo humano. Os extratos foram analisados tanto por CG/DCE como por CG/EM. Os resultados estão apresentados na tabela 13.

**Tabela 13.** Concentrações dos analitos em amostras de soro sanguíneo humano, determinadas por CG/DCE

	Controle		Voluntários							
	1	2	18	20	21	22	23	24	25	26
Concentração / $\mu\text{g L}^{-1}$										
Clorpirifós	ND	ND	ND	ND	ND	261,4	ND	ND	< LQ	11,4
Bifentrina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
$\lambda$ -cialotrina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Deltametrina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

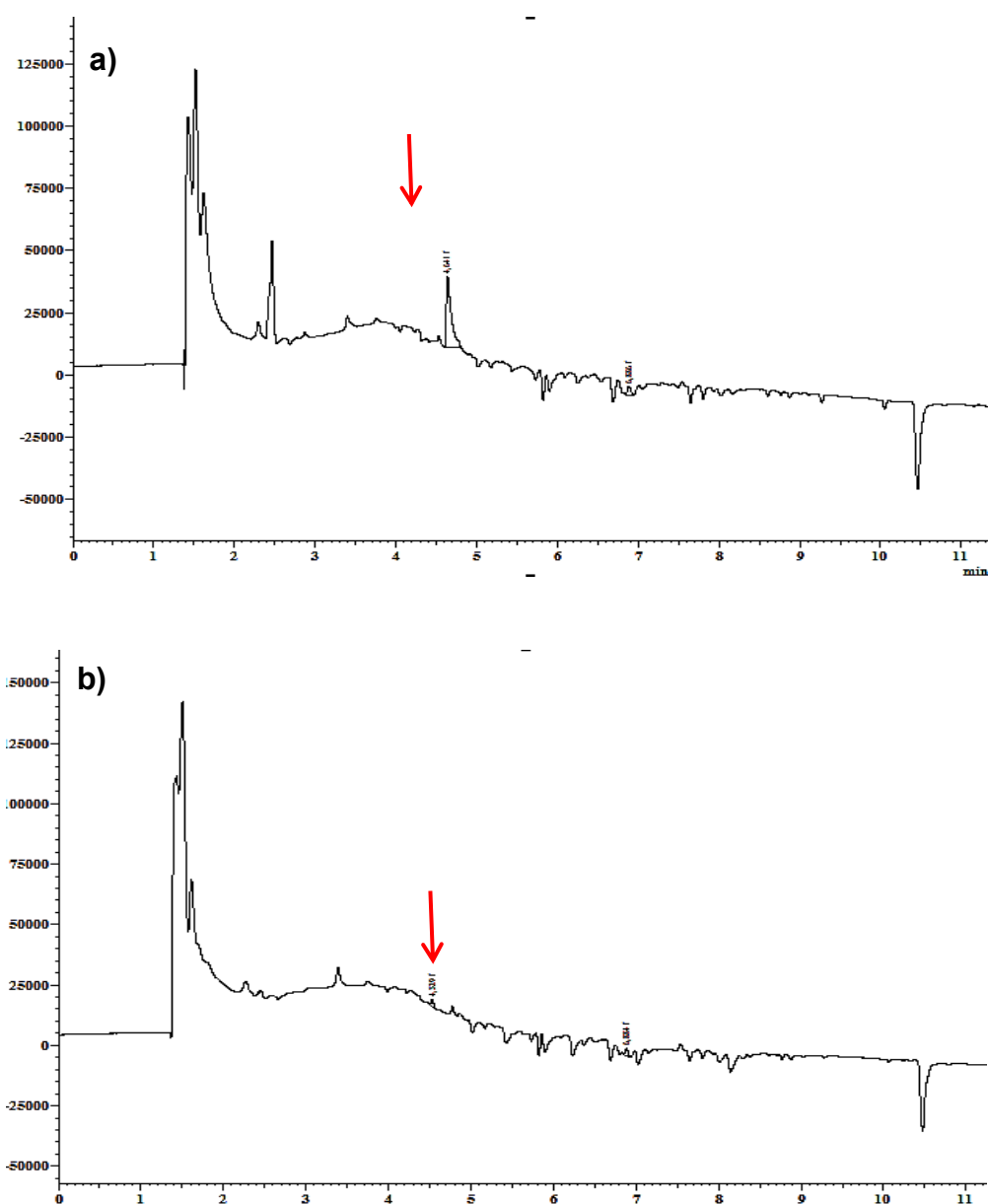
ND – não detectado

LQ – limite de quantificação

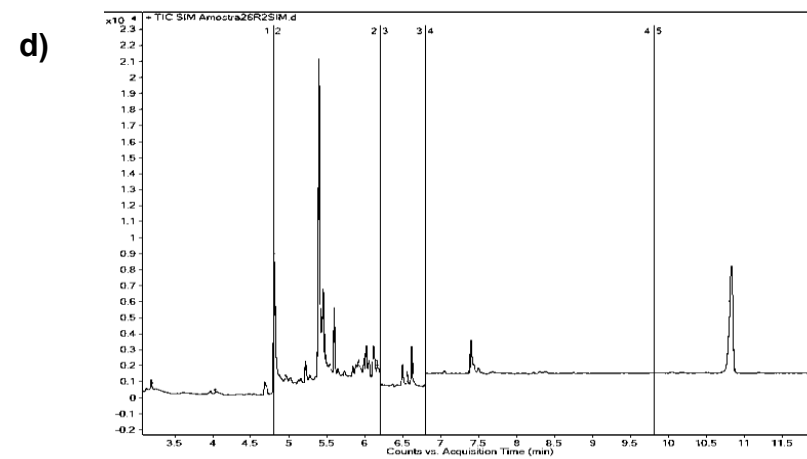
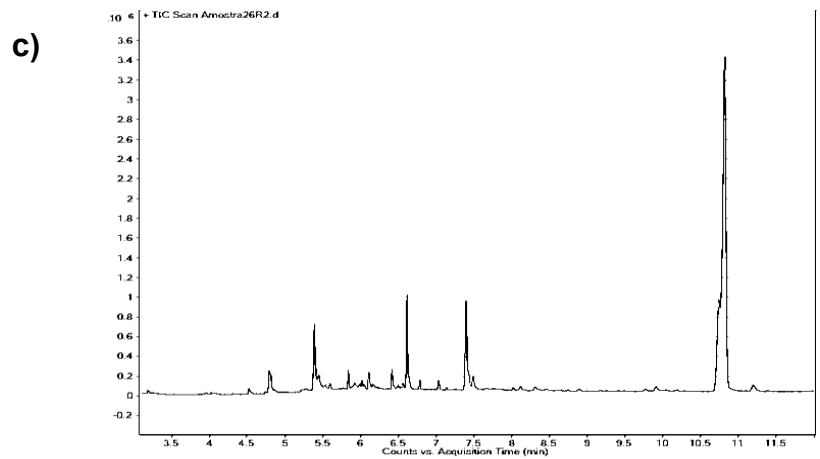
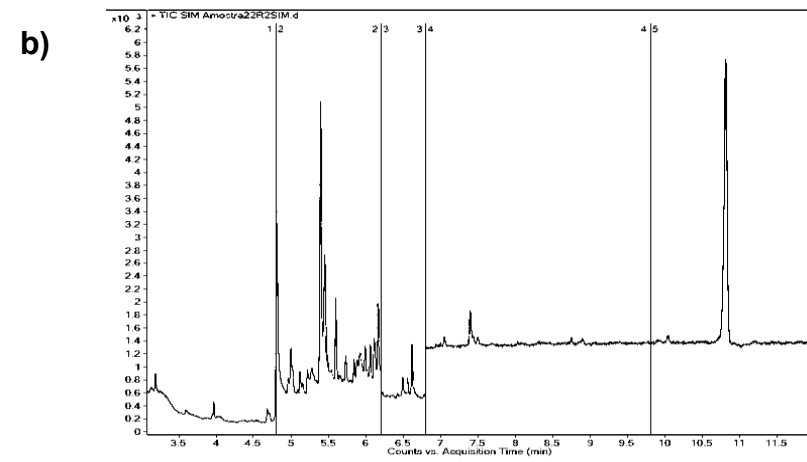
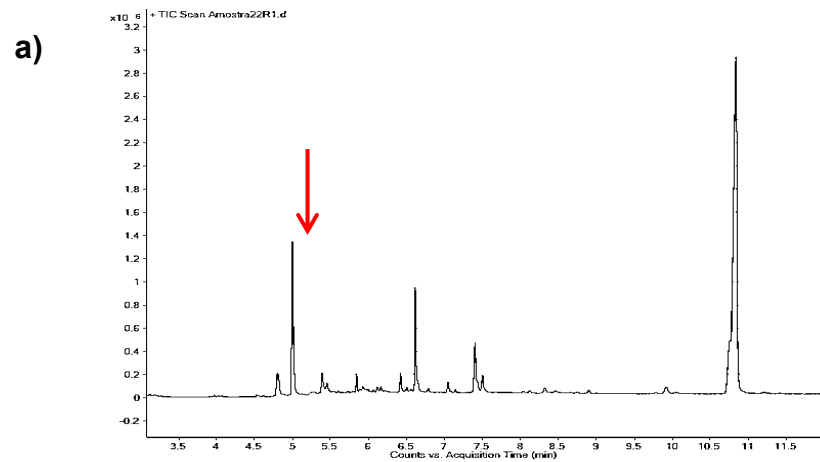
Controle – Voluntário sem contato direto com agrotóxicos.

Os resultados da Tabela 13 foram obtidos com o auxílio do CG/DCE. Esses dados indicam a presença de um pico de  $t_R$  igual ao do clorpirifós em três amostras (22, 25 e 26), sendo que em uma delas (25) a concentração está abaixo do limite de quantificação. Para confirmar estes resultados os extratos foram analisados por CG/EM, no modo Split.

Os cromatogramas das amostras 22 e 26 estão apresentados nas Figuras 25 e 26. Sendo apresentados na Figura 25 os cromatogramas obtidos pelo CG/DCE e na Figura 26 os obtido pelo CG/EM.



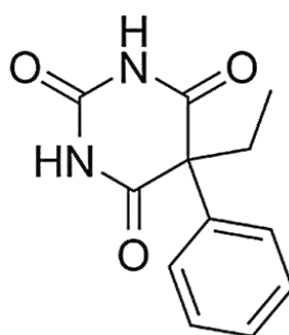
**Figura 25.** Cromatograma do CG/DCE das amostras de soro humano. Sendo: (a) amostra 22 e (b) amostra 26.



**Figura 26.** Cromatograma do CG/EM das amostras de soro humano. Sendo: (a) amostra 22 no modo TIC, (b) amostra 22 no modo SIM, (c) amostra 26 no modo TIC, (d) amostra 26 no modo SIM.

---

A análise da amostra 22 por CG/EM no modo TIC (Figura 26a) constatou a presença de um pico em 5,02 min, o qual foi identificado como fenobarbital com mais de 90% de probabilidade de ser este o analito. Este pico não foi detectado no cromatograma obtido no modo SIM (Figura 26b), devido à ausência dos íons de razões massa/carga selecionados para identificar o clorpirifós. Fenobarbital (Figura 27) é um medicamento muito usado para controle epilepsia, podendo ser usado também no tratamento de insônia, sedação pré-operatória e contra emergências convulsivas (SILVA e HARTMANN, 2006).



**Figura 27.** Estrutura química do 5-Etil-5-fenil-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatrional (fenobarbital).

Comparando as moléculas da Figura 1 e 27 foi possível notar que não há semelhança entre as estruturas, já que elas não apresentam grupos funcionais semelhantes. Além disso, ao avaliar a diferença entre a massa molar do fenobarbital ( $232,24 \text{ g mol}^{-1}$ ) e do clorpirifós ( $350,89 \text{ g mol}^{-1}$ ), esperava-se que não houvesse co-eluição. É provável que a co-eluição tenha ocorrido devido a programação de temperatura usada na análise cromatográfica, que não forneceu uma boa separação para esse dois compostos. Um conhecimento prévio do uso de medicamentos pelos voluntários permitiria otimizar melhor as condições cromatográficas visando a separação desses dois compostos.

O cromatograma da amostra 26 obtido por CG/DCE apresentou um pequeno pico em 5,02 min, correspondente ao  $t_R$  do clorpirifós. No entanto nas análises por CG/EM, no modo TIC, este pico não foi detectado, conforme pode ser observado no cromatograma da Figura 22c. Já um pico de  $t_R$  igual a 5,02 min foi detectado no modo SIM (Figura 22d), indicando que provavelmente este corresponde ao clorpirifós.

---

O CG/EM permitiu confirmar os resultados obtidos por CG/DCE, permitindo avaliar os que eram falso positivo, bem como confirmar a presença de um dos compostos estudados. Por isso, o uso de um equipamento capaz de determinar a concentração do analito e confirmar sua presença é recomendado (BRODIN *et al.*, 2015). No entanto, é importante ressaltar que o detector por captura de elétrons pode ser empregado com sucesso para esse tipo de análise, pois com as informações adequadas é possível desenvolver uma programação que evite a sobreposição de sinais. Sendo assim, nota-se que a aquisição de informações (do histórico) da amostra antes de desenvolver um método analítico é importante, e que isso pode evitar erros no processo de análise das amostras.

---

## 6. CONCLUSÕES

A técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura foi otimizada e validada para a determinação de clorpirifós, bifentrina,  $\lambda$ -cialotrina, e deltametrina em soro fetal bovino por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG/DCE). Sendo empregado um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas para confirmação de resultados quando necessário. O método pode ser considerado viável para análise dos analitos em amostras de soro sanguíneo, por ser simples, eficaz e com baixo consumo de solvente. Além disso, a extração ocorre em uma etapa única.

Pelas análises dos extratos de soro fetal bovino e soro sanguíneo humano, constatou-se que o método proposto poderia ser empregado para identificar e quantificar os analitos de interesse em sangue humano, mesmo havendo diferenças na composição desses.

Para garantir a confiabilidade dos resultados foi feito um estudo de estabilidade do analito na matriz, não sendo observada grande variação na concentração dos analitos, quando as amostras foram armazenadas por 23 dias no freezer e na geladeira. No entanto, as amostras foram melhor preservadas quando armazenadas no freezer, uma vez que não houve a precipitação das proteínas do soro sanguíneo.

O método otimizado e validado foi aplicado em amostras de soro sanguíneo de trabalhadores rurais da região de Coimbra. A maioria das amostras não apresentou resíduos de clorpirifós, bifentrina,  $\lambda$ -cialotrina, e deltametrina. No entanto, em uma das amostras constatou-se a presença de clorpirifós na concentração de  $11,4 \mu\text{g L}^{-1}$ . Em outra amostra observou-se a presença de um pico no mesmo tempo de retenção do clorpirifós, entretanto, este foi identificado por CG/EM como sendo um medicamento contra epilepsia (fenobarbital).

Em função dos resultados obtidos, pode-se concluir que o método desenvolvido é capaz de identificar e quantificar a presença de resíduos de clorpirifós, bifentrina,  $\lambda$ -cialotrina, e deltametrina em soro sanguíneo. No entanto, reforça-se a importância de se conhecer o histórico das amostras em estudo, para permitir um melhor desempenho da técnica, bem como o emprego de técnicas que permitam a confirmação da presença do analito de interesse.

---

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2 jun. 2003, seção1, p. 56-59.

ARAÚJO, A.J. de; LIMA, J.S de; MOREIRA, J.C., JACOB, S.D.C.; SOARES, M. D.O., MONTEIRO, M.C.M.; AMARAL, A.M do; KUBOTA, A.; MEYER, A.; COSENZA, C.A.N; NEVES, C.D. & MARKOWITZ, S. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 115-130, 2007.

ARJOMANDI-BEHZAD; L.; YAMINI, Y. & REZAZADEH, M. Extraction of pyridine derivatives from human urine using electromembrane extraction coupled to dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography determination. **Talanta**, v. 126, p. 73-81, 2014

ARREBOLA, F.J.; MARTINEZ-VIDAL, J.L; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. & AKHTAR, M.H. Monitoring of pyrethroid metabolites in human urine using solid-phase extraction followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 401, p. 45-54, 1999.

BARRIONUEVO, W.R. & LANÇAS, F.M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 172-175, 2001.

BLUMBERG, L. M. **Temperature-programmed Gas Chromatography**. Wiley-VCH, Singapore, 2010, 352p.

BORDIN, D.C.M; MESSIAS, M.; LANARO, R.; CAZENAVE, S.O.S. & COSTA, J.L. Análise forense: pesquisa de drogas vegetais interferentes de testes colorimétricos para identificação dos canabinoides da maconha (*Cannabis sativa L.*) **Rev. Química Nova**. p. 2040-2043, 2012.

---

BORDIN, D.C.M; MONEDDEIRO, F.F. da S.S; CAMPOS, E.G de; ALVES, M.N.R; BUENO, L.H.P & MARTINIS, B.S. de. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatographica**, v. 7, p. 125-143, 2015.

BRAIBANTE, M.E.F. & ZAPPE, J.A. A química dos agrotóxicos. **Química Nova na Escola**, v. 34, p. 10-15, 2012.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002 que regulamenta a Lei Federal nº 7082 de 11 de julho de 1989. **Diário Oficial União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 jan. 2002, Seção 1, p. 1.

CASSAL, V.B.; AZEVEDO, L.F. de; FERREIRA, R.P.; SILVA, D.G. da & SIMÃO, R.S. Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental (Fechada para submissões por tempo indeterminado)**, v. 18, p. 437-445, 2014.

CASSIANO, N.M.; BARREIRO, J.C.; MARTINS, L.R.; OLIVEIRA, R.V. & CASS, Q.B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, p. 1021-1030, 2009

CASTRO, R.S.D. de; DAIUTO, É.R. & VIEITES, R.L. Análise microbiológica e de pesticidas em tomates consumidos em restaurantes em Botucatu-SP. **Nativa**, v. 4, p. 398-402, 2016.

CASTRO, V.L.S. de & CHIORATO, S.E. Effects of separate and combined exposure to the pesticides methamidophos and chlorothalonil on the development of suckling rats. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 210, p. 169-176, 2007.

CHASIN, A.A.D.M. Parâmetros de confiança analítica e irrefutabilidade do laudo pericial em toxicologia Forense. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 14, p. 40-46, 2001.

---

CHAMBERS, H.W.; BOONE, J.S.; CARR, R.L. & CHAMBERS, J.E. **Chemistry of Organophosphorus Insecticides**. Handbook of Pesticide Toxicology Volume 2: Agents. Chapter 44. 2 ed. Academic Press. San Diego, 2001a.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. & BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia. **Unicamp**, p. 398, 2006

COSTA, J.L. **Eletroforese capilar como ferramenta analítica para toxicologia forense**. 2008. 185f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade de São Paulo - USP. 2008.

DUCA, R.C.; SALQUEBRE, G.; HARDY, E. & APPENZELLER, B.M. Comparison of solid phase- and liquid/liquid-extraction for the purification of hair extract prior to multi-class pesticides analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 955, p. 98-107, 2014.

EATON, D.L.; DAROFF, R.B.; AUTRUP, H.; BRIDGES, J.; BUFFLER, P.; COSTA, L.G.; COYLE, J.; MCKHANN, G.; MOBLEY, W.C.; NADEL, L.; NEUBERT, D.; SCHULTE-HERMANN, R. & SPENCER, P.S. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. **Critical reviews in toxicology**, v. 38, p. 1-125, 2008.

FERNÁNDEZ, P.; REGENJO, M.; BERMEJO, A.M.; FERNÁNDEZ, A.M.; & LORENZO, R.A.; CARRO, A.M. Analysis of drugs of abuse in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, p. 418-425, 2015.

FISICHELLA, M.; ODOARDI, S. & STRANO-ROSSI, S. High-throughput dispersive liquid/liquid microextraction (DLLME) method for the rapid determination of drugs of abuse, benzodiazepines and other psychotropic medications in blood samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and application to forensic cases. **Microchemical Journal**, v. 123, p. 33-41, 2015.

FRANCISCO, J.W. E. & FRANCISCO, W. Proteínas: Hidrólise, precipitação e um tema para o ensino de Química. **Química Nova na Escola**, v. 24, p. 12-16, 2006.

---

FREITAS, C.M. de & BRITO SÁ, I.M. de. Por um gerenciamento de riscos integrado e participativo na questão dos agrotóxicos. **É veneno ou é remédio? : Agrotóxicos, saúde e ambiente**, p. 211, 2003.

FREIRE, E.F., MIRANDA, J.L., MAIA, P.P., VIEIRA, E.P., & BASTOS, K. Diazepam e nordiazepam em plasma: métodos de extração líquido-líquido e em fase sólida no pré-tratamento de amostras para análise cromatográfica em fase líquida. **Quim. Nova**, v. 28, n. 5, p. 773-776, 2005.

FRIGGI, C. A. **Avaliação de um modulador a ar comprimido para CG x CG e sua aplicação para determinação de resíduos de pesticidas piretróides em uvas**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2008.

GALLI, A; SOUZA, D; GARBELLINI, G. S; COUTINHO, C. F. B; MAZO, L.H.; ACALA, L.A. & MACHADO, S.A.S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de agrotóxicos em alimentos. **Química Nova**, v.29 , n.1, 2006.

GARCIA, G.E. **Avaliação das consequências da “Lei dos Agrotóxicos” nas intoxicações e nas classificações toxicológicas e de potencial de periculosidade ambiental no período de 1990 a 2000**. 2001. 202 f. Tese (Doutorado em saúde ambiental) – Universidade de São Paulo, São Paulo,SP, 2001.

GILAR, M.; BOUVIER, E.S.P. & COMPTON, B.J. Advances in sample preparation in electromigration, chromatographic and mass spectrometric separation methods. **Journal of chromatography A**, v. 909, p. 111-135, 2001.

GOMES,M.S. **Contributo da química forense na detecção de drogas de abuso**. 2013. 91f. Dissertação (Mestrado em química) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2013.

GOTTZEIN, A.K.; MUSSHOF, F.; DOBERENTZ, E. & MADEA, B. Combined suicide by oxydemeton-methyl (Metasystox®) ingestion and hanging. **Forensic**

---

**Science international**, v. 189, p. e21-e25, 2009.

GOULART, S. M. **Extração de deltametrina e cipermetrina de leite e análise por cromatografia gasosa**. 60f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.

GOULART, S. M.; ALVES, R.D.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, J.H.; ASSIS, T. C. & QUEIROZ, M. E. L. R. Optimization and validation of liquid-liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. **Analytica Chimica Acta**, v. 671, p. 41-47, 2010.

HAJSLOVÁ, J. & ZROSTLÍKOVÁ, J. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p.181-197, 2003.

HYÖTYLÄINEN, T. Critical evaluation of sample pretreatment techniques. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 394, p. 743-758, 2009.

IBAMA. Instituto brasileiro do meio ambiente e dos recursos naturais renováveis. **Boletim de comercialização de agrotóxicos e afins - Histórico das vendas – 2000 a 2012**.  
[http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade\\_Ambiental/boletim%20de%20comercializacao\\_2000\\_2012.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/boletim%20de%20comercializacao_2000_2012.pdf). Acesso em 27 de maio de 2016.

INMETRO – INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008, 2010.

INOUE, S.; SAITO, T.; MASE, H.; SUZUKI, Y.; TAKAZAWA, K.; YAMAMOTO, I. & INOKUCHI, S. Rapid simultaneous determination for organophosphorus pesticides in human serum by LC-MS. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 44, p. 258-264, 2007.

IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry.

---

<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/atoz.htm>. Acesso em 17 de dezembro de 2016.

JARDIM, I.C.S.F. & ANDRADE, J.D.A. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: Uma preocupação ambiental global-Um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, p. 996-1012, 2009.

KIM, M.; SONG, N.R.; HONG, J.; LEE, J. & PYO, H. Quantitative analysis of organochlorine pesticides in human serum using headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 92, p. 279-285, 2013.

KLIMA, M.; ALTENBURGER, M.J.; KEMPF, J.; AUWÄRTER, V. & NEUKAMM, M.A. Determination of medicinal and illicit drugs in post mortem dental hard tissues and comparison with analytical results for body fluids and hair samples. **Rev. Forensic Science International**. p. 166-171, 2016.

KRISTENSON, E.M.; RAMOS, L. & BRINKMAN, U.A. Recent advances in matrix solid-phase dispersion. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, p. 96-111, 2006.

LONDRES, F. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. **Rio de Janeiro: AS-PTA–Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa**, p. 190, 2011.

LUCHINI, L.C. & ANDRÉA, M.M. de. Comportamento ambiental de agrotóxicos. **Horticultura Brasileira**, v. 18, p. 33-35, 2000.

MAGALHÃES, E.J.; NASCENTES, C.C.; AUGUSTI, R. ; QUEIROZ, M.E.L.R. de; SILVA, J.C.C. & AFONSO, R.J.C.F. Fast determination of benzodiazepines in human urine via liquid-liquid extraction with low temperature partitioning and LC-HRMS. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 03, p. 118-124, 2012.

MARTHE, D.D.B; BITTENDOURT, L.M., QUEIROZ, M.E.L.R. de & NEVES, A.A. Desenvolvimento de Metodologia parágrafo Determinação de piretróides em manteiga. **Química Nova**, v. 33, p.1389-1393, 2010

---

MASTOVSKA, K & LEHOTAY, S.J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**. v. 1040, p. 259–272, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 4ª ed. **Jarbas Barbosa da Silva Jr. (Diretor)**, do **Centro Nacional de Epidemiologia (CENEPI/FNS)**. p. 523, 1998.

MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D. & WIDDOP, B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. **Fourth Edition**, 2004.

MOREIRA, B.J.; YOKOYA, J. M. C. & GAITANI, C.M de. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos, inovações e aplicações biológicas. **Scientia Chromatographica**, v. 6, p. 186-204, 2015.

MOREIRA, J.C., JACOB, S.C., PERES, F., LIMA, J. S., MEYER, A., OLIVEIRA-SILVA, J.J., ... & ARAÚJO, A.D. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.7, p.299-311, 2002.

MORI, M.N. **Descontaminação de embalagens de clorpirifós utilizando o processo de oxidação avançada por radiação ionizante**. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciência na Área de Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, SP, 2006.

NELSON, D.L. & COX, M. M. Lehninger princípios de bioquímica. **Omega**, 3ª edição, p. 977, 2009.

NORONHA, L.M.S.; NEVES, A.A. ; QUEIROZ, M.E.L.R. ; OLIVEIRA, A.F. Evaluation of the Effects of Hofmeister Serie on Salting Out in the Determination of Organophosphorous Pesticides and Pyrethroids by LDS/DLLME. **Journal of the Brazilian Chemical Society (Impresso)**, v. 26, p. 1897-1901, 2015.

Oliveira, A.R.M.D., Magalhães, I.D.S., Santana, F.J.M.D., & Bonato,

---

P.S. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S. & REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 1190-1198, 2008.

PERES, F.; MOREIRA, J.C & DUBOIS, G.S. É veneno ou é remédio?: Agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro. **Editora FIOCRUZ**, v. 384, 2003.

PERES, F.; ROZEMBERG, B. & LUCCA, S.R. de. Percepção de risco no trabalho rural em uma região agrícola do Estado do Rio De Janeiro, Brasil: agrotóxicos, saúde e ambiente. **Cad. Saúde Pública**. Rio de Janeiro, p.1836-1844, 2005.

PERES, F.; SILVA, J.J.O.; ROSA, H.V.D. & LUCCA, S.R. de. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, p. 27-37, 2005.

PICÓ, Y.; BLASCO, C. & FONT, G. Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: Na overview. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 23, p. 45-85, 2004.

PINHO, G.P. **Efeito de components da Matriz na análise de agrotóxicos por cromatografia gasosa**. 2009. 120 f. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, MG, 2009.

PINHO, G.P; QUEIROZ, M.E.L.R; NEVES, A.A & SILVÉRIO, F.O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v.32, p. 987-995, 2009.

PINHO, G.P; SILVÉRIO, F.O.; QUEIROZ, M.E.L.R; NEVES, A.A & STARLING, V.M. Influência dos constituintes químicos do extratos de diferentes matrizes na resposta cromatográfica de agrotóxicos. **Química Nova**, v.33, p. 909-913, 2010.

---

POLSON, C.; SARKAR, P.; INCLEDON, B.; RAGUVARAN, V. & GRANT, R. O optimization of protein precipitation based upon effectiveness o protein removal and ionization effect in liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 785, p. 263-275, 2003.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H. & JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova** , v. 24, p. 68-76, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLIN, C.H.; JARDIM, I. C. S. F. & MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBAS, P.P. & MATSUMURA, A.T.S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, v. 10, p. 149-158, 2009.

RIBEIRO, A.C.C & MELLA, E.A.C. Intoxicação ocupacional por organofosforados – a importância da dosagem de colinesterase. **Iniciação Científica Cesumar**, v. 9, p. 125-134, 2007.

ROOD, D. **The Troubleshooting and Maintenance Guide for Gas Chromatographers**. Wiley-VCH, Singapure, 2007, 346p.

SANTOS, M.A.T. dos; AREAS, M.A. & REYES, F.G.R. Piretróides–uma visão geral. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, p. 339-349, 2007.

SANTOS, S.B. **Elementos traços em soro sanguíneos medidos pelo métodos PIXE e ICP-MS**. 2007. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2007.

SILVA, H.T.H. & HARTMANN, A.A. A relação do uso crônico de fenobarbital com áreas potencialmente pré-neoplásicas em fígado de ratos. **Arq Gastroenterol**, p. 121-124, 2006.

---

SILVA, J.M. da; SILVA, E.N; FARIA, H.P & PINHEIRO, T.M.M. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10 p. 891-903, 2005

SINITOX. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. [http://sinitox.iciet.fiocruz.br/sites/sinitox.iciet.fiocruz.br/files//Tabela%206\\_2012.pdf](http://sinitox.iciet.fiocruz.br/sites/sinitox.iciet.fiocruz.br/files//Tabela%206_2012.pdf). Acesso em 26 de janeiro de 2017.

SMITH, R. M. Before the injection-modem methods of samplepreparation for separation techniques.**Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 3-27, 2003.

SOUSA, D.A.; GONÇALVES, R.M.; HELENO, F.F.; QUEIROZ, M.E.L. de & MARCHI, M.R.R. de. Chemometric optimization of solid–liquid extraction with low-temperature partition (SLE-LTP) for determination of persistent organic pollutants in Caiman yacare eggs. **Microchemical Journal**, v. 114, p. 266-272, 2014.

SOUSA, J.A. de; FEITOSA, H.D.O.; CARVALHO; C.M. de; PEREIRA, C.F.; FEITOSA, S.D.O & SILVA,S.L. de. Percepção dos produtores rurais quanto ao uso de agrotóxicos. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada v**, v. 10, p. 976-989, 2016.

SOUZA, M.H.L. & ELIAS, D.O. Fundamentos da Circulação Extracorpórea. Rio de Janeiro-RJ.**Editora Alfa Rio**, 2ª Ed.,f. 828 , 2006.

TARAZONA, I.; CHISVERT, A. & SALVADOR, A. Determination of benzophenone-3 and its main metabolites in human serum by dispersive liquid–liquid microextraction followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 116, p. 388-395, 2013.

THOMAS, A.; TOMS, L-M.L.; HARDEN, F.A.; HOBSON, P.; WHITW, N.M.; MENGERSEN, K.L. & MUELLER, J.F. Concentrations of organochlorine pesticides in pooled human serum by age and gender. **Environmental Research**, v. 154, p. 10-18, 2017.

---

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R. & WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. **Pure Applied Chemistry**, v.74, n.5, p.835-855, 2002

VERSCOYLE, R. D. & ALDRIDGE, W. N. Structure-activity relationships of some pyrethroids in rats. **Archives of toxicology**, v. 45, p. 325-329, 1980.

WAHLUND, K.-G. Separation of acidic drugs in the µg/ml range in untreated blood plasma by direct injection on liquid chromatographic columns. **Journal of Chromatography A**, v. 218, p. 671-679, 1981.

International program on chemical safety; inter-organization programme for the sound management of chemicals; world health organization. **WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009**. World Health Organization, 2010

YAZDI, A.S.; RAZAVI, N. & YAZDINEJAD, S.R. Separation and determination of amitriptyline and nortriptyline by dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography flame ionization detection. **Talanta**, v. 75, p. 1293-1299, 2008.

YUAN, Y.; CHEN, C.; ZHENG, C.; WANG, X.; YANG, G.; WANG, Q. & ZHANG, Z. Residue of chlorpyrifos and cypermethrin in vegetables and probabilistic exposure assessment for consumers in Zhejiang Province, China. **Food Control**, v. 36, p. 63-68, 2014.