

CARLOS EDUARDO DOS SANTOS SOARES

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS HIFENADOS COM MICROEXTRAÇÃO  
EM GOTA ÚNICA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE  
AGROTÓXICOS EM ÁGUA E SOLO POR CROMATOGRÁFIA GASOSA**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2015

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

T

S676d  
2015  
Soares, Carlos Eduardo dos Santos, 1983-  
Desenvolvimento de métodos hifenados com  
microextração em gota única para determinação de  
resíduos de agrotóxicos em água e solo por cromatografia  
gasosa / Carlos Eduardo dos Santos Soares. - Viçosa, MG,  
2015.

xiv, 87f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Antônio Augusto Neves.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 84-87.

1. Química analítica. 2. Extração (Química).  
3. Produtos químicos agrícolas. 4. Água - Análise. 5. Solos -  
Análise. 6. Cromatografia à gás. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Química. Programa de  
Pós-graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 543.072

CARLOS EDUARDO DOS SANTOS SOARES

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS HIFENADOS COM MICROEXTRAÇÃO  
EM GOTA ÚNICA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE  
AGROTÓXICOS EM ÁGUA E SOLO POR CROMATOGRAFIA GASOSA.**

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

APROVADA: 10 de março de 2015

\_\_\_\_\_  
Prof. Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz  
(Co-orientadora)

\_\_\_\_\_  
Prof. André Fernando de Oliveira  
(Co-orientador)

\_\_\_\_\_  
Prof. José Humberto de Queiroz

\_\_\_\_\_  
Prof. Clésia Cristina Nascentes

\_\_\_\_\_  
Prof. Antônio Augusto Neves  
(Orientador)

"Por vezes sentimos que aquilo  
que fazemos não é senão uma gota  
de água no mar. Mas o mar seria menor  
se lhe faltasse uma gota."

Madre Teresa de Calcutá

*A Deus,  
Aos meus pais José e Terezinha,  
Aos meus irmãos Cláudio e Camilo,  
À Patrícia,*

*Pelo amor e apoio incondicionais,  
dedico este trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Expresso meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram com a realização do presente estudo.

A Deus, que em todos os momentos me sustentou, me deu forças para continuar pois sem Ele nada teria sido realizado e pela sua infinita misericórdia.

A meus pais, José e Terezinha, que me incentivaram e amaram de forma incondicional. Obrigado por tudo.

Aos meus irmãos Cláudio e Camilo, minha cunhada Marisa e meus sobrinhos Matheus e Daniel pelo carinho e incentivo.

A minha namorada Patrícia por me amar e em todos os momentos me apoiar e me dar forças para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, particularmente ao Departamento de Química, que contribuiu para a realização deste trabalho.

A CAPES/REUNI pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Antônio Augusto Neves pela confiança, orientação, conversas, disposição em ajudar, pela agradável convivência e pela amizade.

Em especial, aos professores Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz e André Fernando de Oliveira, pelos ensinamentos transmitidos, incentivo, pela dedicada orientação e, sobretudo, pela amizade sincera.

Aos professores Efraim (exame de qualificação), Clésia e José Humberto que se dispuseram a participar da banca.

A todos os AMIGOS, que estiveram presentes nesta fase da minha vida me apoiando e cuidando para que meus dias fossem mais felizes.

A minha amiga-irmã Anna Isabel pelos momentos que passamos juntos durante todo esse tempo sendo apoio um para o outro nessa jornada científica.

A todos os amigos do laboratório de química analítica - LAQUA: Adley, Adriana (Dridris), Alessandra, Marcos (a “zueira” não pode parar), Nelson, Thaís, Gleissy, Mayara, Raquel, Agatha, Luiz Felipe, Dudu, Cris, Isadora, Fernanda, Flaviane, Mariane, Luiz Manoel, Renata, Roberta, Luiz Phillip, Mariana, Robson, Tia Rosa (abraço mais gostoso da terça feira), Laurence, Jéssika, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## BIOGRAFIA

CARLOS EDUARDO DOS SANTOS SOARES, filho de José Soares da Silva e Terezinha Maria dos Santos Silva, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 11 de junho de 1983.

Em março de 2004, iniciou o curso de Graduação em Química pela Universidade Federal de Viçosa, diplomando-se como bacharel e licenciado em janeiro de 2009. Em março deste mesmo ano, iniciou o curso de Pós-Graduação em Agroquímica, em nível de mestrado, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2011. Em março do mesmo ano iniciou o curso de Pós-Graduação em Agroquímica, em nível de doutorado submetendo-se à defesa de tese em março de 2015.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIações.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Capítulo 1- Otimização, validação e aplicação da técnica microextração em gota única em amostras de água.....	4
1- INTRODUÇÃO.....	4
2-OBJETIVOS.....	8
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5. CONCLUSÃO.....	36
Capítulo 2 – Hifenação das técnicas extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura com a microextração em gota única para a determinação de resíduos de agrotóxico em solo.....	37
1- INTRODUÇÃO.....	37
2-OBJETIVOS.....	40
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5- CONCLUSÕES.....	60
Capítulo 3 – Hifenação das técnicas extração QuEChERS com a microextração em gota única para a determinação de resíduos de agrotóxico em solo.....	61
1- INTRODUÇÃO.....	61
2-OBJETIVOS.....	65
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	66
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
5- CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

## LISTA DE ABREVIações

**4,4'-DDT** – 4,4'-(2,2,2- triclorometano-1,1-diyl bisclorobenzeno)

**ACN**- Acetonitrila

**CG/DCE**- Cromatógrafo a gás com detector por captura de elétrons

**CV**- coeficiente de variação

**Fort.** – Concentração de fortificação

**HS**- *Headspace*

**INMETRO**- Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia

**k**- constante cinética

**LAQUA**- Laboratório de Química Analítica

**LD**- limite de detecção

**LLE**- extração líquido-líquido

**LLE/LTP**- Extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura

**LQ**- Limite de quantificação

**MAPA**- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

**MEFS**- Microextração em fase sólida

**MS**- Ministério da Saúde

**MSPD**- Dispersão da matriz em fase sólida

**PSA**- Amina primária secundária

**PTFE**- Politetrafluoretileno

**r**- coeficiente de correlação

**R<sup>2</sup>** – coeficiente de determinação

**rpm**- Rotações por minuto

**RSD**- Desvio Padrão Relativo

**s**- desvio padrão da resposta

**S**- inclinação da curva analítica

**SDME**- Microextração em gota única

**SLE/LTP**- Extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura

**SPE**- extração em fase sólida

**S<sub>res</sub>** – desvio padrão do resíduo

**t**- tempo

**LMR**- Limites máximos de resíduos

# LISTA DE FIGURAS

## Capítulo 1- Otimização, validação e aplicação da técnica microextração em gota única em amostras de água

<b>Figura 1.1-</b> Desenho esquemático dos principais modos de extração em SDME: (A) modo direto e em (B) <i>headspace</i> .....	6
<b>Figura 1.2-</b> Variação da área do pico cromatográfico de cada agrotóxico em função do volume de microgota utilizado na extração dos agrotóxicos pela SDME.....	20
<b>Figura 1.3-</b> Área do pico cromatográfico em função do tempo de exposição da gota para os 8 agrotóxicos estudados em água.....	21
<b>Figura 1.4 -</b> Diagrama de Pareto dos efeitos dos fatores força iônica temperatura da amostra e solvente extrator, sobre a extração dos agrotóxicos de amostras de água usando SDME.....	22
<b>Figura 1.5-</b> Cromatogramas do extrato do branco de água (A) sobreposto ao do branco fortificado na concentração de 30 µg L <sup>-1</sup> (B). Os picos mostrados 1. Trifluralina (t <sub>R</sub> =3,56), 2. Alaclor (t <sub>R</sub> =4,20) 3. Lindano (t <sub>R</sub> =5,07), 4. parationa metílica (t <sub>R</sub> =5,18), 5. alfa endossulfam (t <sub>R</sub> =7,45), 6. Dieldrin (t <sub>R</sub> =8,17), 7 Endrin. (t <sub>R</sub> =8,85), 8. beta endossulfam (t <sub>R</sub> =9,19), e 9. 4,4'- DDT (t <sub>R</sub> =11,06).....	24
<b>Figura 1.6 -</b> Gráficos de resíduos para o ajuste linear para o princípio ativo 4,4'- DDT.....	26
<b>Figura 1.7-</b> Diagrama de distribuição dos pontos no estudo cinético e dos resíduos dos diferentes modelos cinéticos para o lindano.....	33

## **Capítulo 2- Hifenação das técnicas extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura com a microextração em gota única para a determinação de resíduos de agrotóxico em solo**

**Figura 2.1-** Gráfico de Pareto para os efeitos tipo agitação, volume de acetato e tempo de refrigeração na otimização da SLE/LTP para amostras de solo.....50

**Figura 2.2-** Cromatogramas do branco de amostra de solo (A) e amostra fortificada a  $30 \mu\text{g kg}^{-1}$  (B). Os picos mostrados 1. Trifluralina ( $t_R = 3,56$ ), 2. Alaclor ( $t_R = 3,56$ ), 3. Lindano ( $t_R = 5,06$ ), 4. parationa metílica ( $t_R = 5,17$ ), 5. Endrin ( $t_R = 8,14$ ), 6. Dieldrin ( $t_R = 8,82$ ) e 7. 4,4'- DDT ( $t_R = 11,02$ ).....53

## **Capítulo 3- Hifenação das técnicas extração QuEChERS com a microextração em gota única para a determinação de resíduos de agrotóxico em solo**

**Figura 3.1-** Fluxograma do método QuEChERS original.....63

**Figura 3.2-** Cromatogramas do branco de amostra de solo (A) e amostra fortificada a  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  (B). Os picos mostrados 1. Trifluralina ( $t_R = 3,56$ ), 2. Alaclor ( $t_R = 3,56$ ), 3. Endrin ( $t_R = 7,14$ ), 4. Dieldrin ( $t_R = 7,82$ ) e 5. 4,4'- DDT ( $t_R = 10,02$ ).....74

**Figura 3.3** - Gráfico de resíduos para o ajuste linear para as respostas cromatográficas do princípio ativo trifluralina.....75

# LISTA DE TABELAS

## Capítulo 1- Otimização, validação e aplicação da técnica microextração em gota única em amostras de água

<b>Tabela 1.1-</b> Estrutura, classe química e valores máximos permitidos para os oito agrotóxicos em água. (Portaria 2914 de 12/12/2011 do Ministério da Saúde) ....5	5
<b>Tabela 1.2-</b> Planejamento fatorial $2^3$ para avaliação de três fatores na recuperação de agrotóxicos em água usando a técnica SDME.....12	12
<b>Tabela 1.3</b> – Critérios de aceitação da reprodutibilidade segundo o MAPA..... 13	13
<b>Tabela 1.4-</b> Concentrações de cada agrotóxico para os ensaios de precisão intermediária e repetitividade..... 15	15
<b>Tabela 1.5-</b> Concentrações utilizadas para determinação do fator de enriquecimento para cada agrotóxico.....16	16
<b>Tabela 1.6-</b> Relação das amostras de água analisadas..... 18	18
<b>Tabela 1.7-</b> Equações de regressão linear e os coeficientes de correlação para os oito agrotóxicos na faixa de trabalho estudada.....26	26
<b>Tabela 1.7.</b> Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) do método SDME e o valor máximo permitido para os agrotóxicos estudados em amostra de água .....27	27
<b>Tabela 1.9-</b> Porcentagens de recuperação média obtida pela análise de extratos de amostra de água fortificada com os agrotóxicos em três níveis de concentrações diferentes.....29	29
<b>Tabela 1.10-</b> Área média dos analitos e coeficientes de variação (CV) obtidos para análise dos sete extratos obtidos de amostras de água fortificadas com os agrotóxicos.....30	30
<b>Tabela 1.11-</b> Valores de áreas médias e coeficientes de variação (CV) obtidos pela análise de extratos obtidos de amostra de água fortificada com os agrotóxicos, nas concentrações apresentadas na tabela 3 em três dias diferentes.....31	31
<b>Tabela 1.12-</b> Fator de enriquecimento para cada um dos princípios ativos avaliados.....32	32

<b>Tabela 1.13-</b> Equações dos modelos obtidos, coeficientes de determinação ( $r^2$ ), desvio padrão dos resíduos ( $S_{res}$ ) e valores da constante cinética (k) para os modelos estudados para o agrotóxico lindano.....	32
<b>Tabela 1.14 -</b> Parâmetros obtidos da cinética de transferência de matéria pelo modelo de Noyes- Whitney para agrotóxicos em SDME.....	33
<b>Tabela 1.15-</b> Porcentagem de recuperação relativa para amostras fortificadas de água.....	35

## **Capítulo 2- Hifenação das técnicas extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura com a microextração em gota única para a determinação de resíduos de agrotóxico em solo**

<b>Tabela 2.1-</b> Planejamento fatorial $2^3$ para avaliação dos fatores na recuperação de agrotóxicos em solo usando a técnica SLE/LTP.....	43
<b>Tabela 2.2-</b> Concentrações das amostras avaliadas nos ensaios de precisão (repetitividade e precisão intermediária) para cada agrotóxico.....	46
<b>Tabela 2.3-</b> Concentrações das amostras de solo avaliadas para determinação do fator de enriquecimento.....	47
<b>Tabela 2.4-</b> Localização dos pontos onde foi realizada a coleta das amostras e as principais propriedades físico-químicas dos solos .....	48
<b>Tabela 2.5-</b> Valores para a faixa de trabalho, equações de regressão linear e os coeficientes de correlação para os sete agrotóxicos.....	54
<b>Tabela 2.6-</b> Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método SLE/LTP/ SDME para os agrotóxicos estudados em amostra de solo.....	55
<b>Tabela 2.7-</b> Porcentagens de recuperação relativa média e coeficientes de variação (CV) obtidos pela análise de extratos obtidos de amostra de solo fortificada com os agrotóxicos em três níveis de concentrações diferentes.....	56
<b>Tabela 2.8-</b> Área dos analitos e coeficientes de variação (CV) obtidos para análise dos sete extratos obtidos de amostras de solo fortificadas com os agrotóxicos.....	57
<b>Tabela 2.9-</b> Valores de áreas médias e coeficientes de variação (CV) obtidos pela análise de extratos obtidos de amostra de solo fortificada com os agrotóxicos, em três dias diferentes.....	58
<b>Tabela 2.10-</b> Fator de enriquecimento para cada um dos princípios ativos avaliados.....	58

<b>Tabela 2.11-</b> Porcentagem de recuperação para amostras fortificadas de solo.....	59
--	----

**Capítulo 3- Hifenção das técnicas extração QuEChERS com a  
microextração em gota única para a determinação de resíduos de  
agrotóxico em solo**

<b>Tabela 3.1-</b> Localização dos pontos onde foi realizada a coleta das amostras de solo.....	70
<b>Tabela 3.2-</b> Valores para a faixa de trabalho, equações de regressão linear e os coeficientes de correlação para os sete agrotóxicos.....	74
<b>Tabela 3.3-</b> Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método QuEChERS- SDME para os agrotóxicos estudados em amostra de solo.....	76
<b>Tabela 3.4-</b> Porcentagens de recuperação relativa média e coeficientes de variação (CV) obtidos pela análise de extratos obtidos de amostra de solo fortificada com os agrotóxicos em três níveis de concentrações diferentes.....	77
<b>Tabela 3.5-</b> Área dos analitos e coeficientes de variação (CV) obtidos para análise dos sete extratos obtidos de amostras de solo fortificadas com os agrotóxicos.....	78
<b>Tabela 3.6-</b> Valores de áreas médias e coeficientes de variação (CV) obtidos pela análise de extratos obtidos de amostra de solo fortificada com os agrotóxicos, em três dias diferentes.....	78
<b>Tabela 3.7-</b> Fator de enriquecimento para cada um dos princípios ativos avaliados.....	79
<b>Tabela 3.8-</b> Porcentagem de recuperação para amostras fortificadas de solo.....	80
<b>Tabela 3.9-</b> Comparação entre as principais figuras de mérito da validação das técnicas QuEChERS- SDME e SLE/LTP- SDME.....	81

## RESUMO

SOARES, Carlos Eduardo dos Santos, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2015. **Desenvolvimento de métodos hifenados com microextração em gota única para determinação de resíduos de agrotóxicos em água e solo por cromatografia gasosa.** Orientador: Antônio Augusto Neves. Coorientadores: André Fernando de Oliveira e Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.

O monitoramento das possíveis contaminações oriundas dos agrotóxicos em amostras ambientais tornou-se um assunto de relevância, devido ao risco que estes compostos causam à saúde humana e ao ambiente. No presente trabalho foram otimizados, validados 3 métodos de extração de resíduos de agrotóxicos em água e solo. Os compostos avaliados foram alaclor, parationa metílica, trifluralina, endossulfam, endrin, lindano, dieldrin e 4,4'-DDT. A microextração em gota única (SDME) para a determinação de agrotóxicos em amostras de água e a hifenação da técnica de microextração em gota única com a extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP-SDME), e a hifenação QuEChERS-SDME para a determinação em solo Os extratos foram analisados por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (GC-ECD). O método SDME para amostras de água apresentou porcentagens de recuperação relativas entre 89,5 e 122,5 %, repetitividade com coeficientes de variação menores que 22,9 %, limites de detecção entre 5,9 e 58,9 ng L<sup>-1</sup>, fator de enriquecimento entre 17 e 448 e o modelo cinético que melhor explica a transferência dos analito da fase aquosa para a fase orgânica é o de Noyes-Whitney. O método hifenado SLE/LTP-SDME para amostras de solo apresentou porcentagens de recuperação relativa entre 83,8 e 122,5 %, coeficientes de variação menores que 22,4%, limites de detecção entre 0,09 e 0,59 µg kg<sup>-1</sup> e fator de enriquecimento entre 1 e 66. Enquanto o método hifenado QuEChERS-SDME para determinação de resíduos de agrotóxicos em solo apresentou recuperação entre 90 e 111,7 %, coeficientes de variação menores que 18,9%, limites de detecção entre 0,41 e 0,99 µg kg<sup>-1</sup> e fatores de enriquecimento entre 13,6 e 49. As figuras de mérito obtidas na validação dos métodos atendem as exigências dos órgãos normativos para baixos níveis de concentração sendo assim possível a aplicação do método SDME em amostras de água e as hifenações em amostras de solo.

## ABSTRACT

SOARES, Carlos Eduardo dos Santos, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, march, 2015. **Development of methods hyphenated with single drop microextraction to determine pesticide residues in water and soil by gas chromatography.** Adviser: Antônio Augusto Neves. Co-advisers: André Fernando de Oliveira and Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.

The monitoring of possible contamination coming from the pesticides in environmental samples has become a relevant issue because of the risk that these compounds cause to human health and the environment. In the present work were optimized, validated three methods of extraction of pesticide residues in water and soil. The compounds evaluated were alachlor, methyl parathion, trifluralin, endosulfan, endrin, lindane, dieldrin and 4,4'-DDT. A single drop microextraction (SDME) for the determination of pesticides in water samples and the hyphenation of microextraction technique in single drop with the solid-liquid extraction with partition at low temperature (ESL / PBT-SDME), and the hyphenation QuEChERS -SDME for determining on the ground. The extracts were analyzed by gas chromatography with electron capture detector (GC-ECD). The SDME method for water samples showed recovery relative percentages between 89.5 and 122.5%, repeatability with lower coefficients of variation 22.9%, detection limits between 5.9 and 58.9 ng L<sup>-1</sup>, enrichment factor between 17 and 448 and the kinetic model that best explains the transfer of analytes from the aqueous phase to the organic phase is the Noyes-Whitney test. The hyphenated method ESL / PBT-SDME for soil samples showed recovery percentages between 83.8 and 122.5 % lower coefficients of variation that 22.4% detection limits between 0.09 and 0.59 µg kg<sup>-1</sup> and enrichment factor between 1 and 66. While the hyphenated method QuEChERS-SDME for determination of pesticide residues in soil, recovered between 90 and 111.7%, lower coefficients of variation that 18.9% detection limits between 0, 41 and 0.99 µg kg<sup>-1</sup> and enrichment factors between 13.6 and 49. The figures of merit obtained in the validation of methods meet the requirements of regulators for low concentration levels so it is possible the application of SDME method in water samples and hyphenated method in soil samples.

## INTRODUÇÃO GERAL

Nas últimas décadas devido ao grande crescimento populacional a necessidade de produção de alimentos tem aumentado, sendo assim uma maior produção agrícola se faz necessária. [1]

Para atender essa demanda é inevitável o uso de compostos naturais ou sintéticos que controlem qualquer tipo de praga ou doença que provoquem danos às culturas. Esse fato que por um lado gera benefícios em termos de aumento da produção e da qualidade das plantações, por outro quando usado de maneira inadequada é responsável pela contaminação do solo, água e alimentos atingindo direta ou indiretamente o ser humano.

A determinação de resíduos desses agrotóxicos desempenha um papel importante para a estimativa do nível de exposição humana e do ambiente a essa contaminação. No entanto, é fundamental o desenvolvimento de métodos de análise para determinação dos compostos nas mais diversas matrizes tais como água, solo, frutas e vegetais. As técnicas cromatográficas são comumente empregadas para esse fim.

No entanto, não é comum determinar pequenas moléculas orgânicas em matrizes na forma bruta. Apesar dos avanços instrumentais ainda é necessário o uso de técnicas de extração para determinação do analito de interesse. Essas técnicas devem reduzir ou eliminar os componentes indesejáveis da matriz. [2,3,4]

As principais técnicas de extração de analitos orgânicos incluem a extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE), dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), extração líquido-líquido ou sólido líquido com partição em baixa temperatura (ELL/ PBT e SLE/LTP) e o método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe). [5]

Contudo, para atender os princípios da Química Verde as tendências atuais apontam no sentido da utilização de menores quantidades de amostras, até mesmo para análises de traços; obtenção de maior seletividade e especificidade na extração; métodos menos agressivos ao meio ambiente, com menor desperdício e, o uso de quantidade mínima ou nenhuma de solventes orgânicos. [6]

Dentro deste contexto, técnicas de microextração, incluindo microextração em fase sólida (MEFS), microextração em gota única (SDME), microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), que não utilizam solvente orgânico ou utilizam em quantidades mínimas e menos etapas na preparação das amostras vêm sendo desenvolvidas e tem ganhado destaque. [7]

Dentre essas técnicas, a microextração em gota única (SDME) foi relatada pela primeira vez em 1996 por Jeannot e colaboradores, para a extração de compostos orgânicos em água, e posterior determinação por cromatografia gasosa.[8] Desde então, a SDME tem sido aplicada como procedimento de extração, sendo bem estabelecida para a determinação de compostos orgânicos por técnicas cromatográficas. [9]

Em SDME, a fase extratora é uma gota de um solvente pouco miscível em água, que é suspensa na ponta da agulha de uma seringa, a qual é imersa em uma solução, usualmente a própria amostra. [9] O procedimento usando SDME consiste de duas etapas. Na primeira etapa, os analitos da matriz são extraídos para a gota. Na segunda, os analitos extraídos pela gota são injetados no instrumento para a detecção.

A técnica SDME oferece vantagens significativas sobre a extração líquido-líquido (ELL) ou extração em fase sólida (SPE), tais como a eliminação quase total da utilização de solventes tóxicos, alto fator de enriquecimento de analitos devido à proporção relativamente pequena da quantidade de solvente em relação à amostra, o uso de um único dispositivo para extração e injeção da amostra. Essas vantagens se tornam mais significativas para análise de resíduos de agrotóxicos, uma vez que a tendência observada na legislação atual é reduzir os limites máximos permitidos de resíduos de agrotóxicos (LMR) em uma variedade de matrizes, sendo crescente o número de amostras a serem analisadas e a necessidade de sua determinação exata em níveis muito baixos. [10]

A SDME tem sido aplicada principalmente para matrizes líquidas como, por exemplo, águas.[11] Contudo devido às limitações tais como a presença de material particulado, elevada turbidez ao adicionar água à amostra sólida ou necessidade de analisar compostos não voláteis, pouco se é retratado sobre a aplicação da SDME em amostras sólidas [12].

Para contornar essas limitações no presente trabalho propõe-se a combinação da técnica de microextração em gota única com outras técnicas de

extração como, por exemplo, a extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) e a técnica de extração QuEChERS. Além disso, a hifenação deve aliar as vantagens de ambas que seriam a obtenção de extratos puros durante o procedimento de extração promovida pela SLE/LTP e pelo QuEChERS a necessidade de uma elevada pré-concentração para atingir os limites de detecção cada vez menores exigidos pela legislação.

A tese é constituída de três capítulos nos quais aplicações da microextração em gota única são apresentadas. No primeiro capítulo a aplicação da técnica SDME direta que foi desenvolvida para a determinação de agrotóxicos em água. No segundo capítulo uma combinação entre as técnicas de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) e a microextração em gota única (SDME) desenvolvida para determinação de agrotóxicos em solo. No terceiro capítulo foi desenvolvida a hifenação das técnicas de microextração em gota única e QuEChRES também para a determinação de agrotóxicos em solo.

## **Capítulo 1- Otimização, validação e aplicação da técnica microextração em gota única em amostras de água**

### **1- INTRODUÇÃO**

O uso indiscriminado de agrotóxicos é motivo de preocupação, uma vez que vários danos à saúde humana e aos ecossistemas podem ser causados. [1] Uma vez no ambiente, os agrotóxicos podem se acumular ou distribuir-se nos diversos compartimentos ambientais, como solo, atmosfera e sistemas aquáticos.

A contaminação dos sistemas aquáticos pode ocorrer de várias maneiras, entre elas pela lixiviação do agrotóxico no solo, carreamento superficial ou mesmo por precipitação. Uma vez contaminada a água os poluentes facilmente chegarão à população humana já que as estações de tratamento convencionais de água não apresentam métodos para determinação e/ou eliminação efetiva de agrotóxicos em água. [13]

Para controlar e regulamentar tal avaliação, em escala nacional, o Ministério da Saúde dispõe de uma série de valores guias fixados pela Portaria MS Nº 2914 de dezembro de 2011 que contemplam uma série de substâncias entre elas alguns agrotóxicos. [14]

A Tabela 1.1 apresenta os valores máximos permitidos de alguns compostos que foram escolhidos para estudo por já serem contemplados por essa portaria para água, assim como a classe pertencente e sua fórmula estrutural.

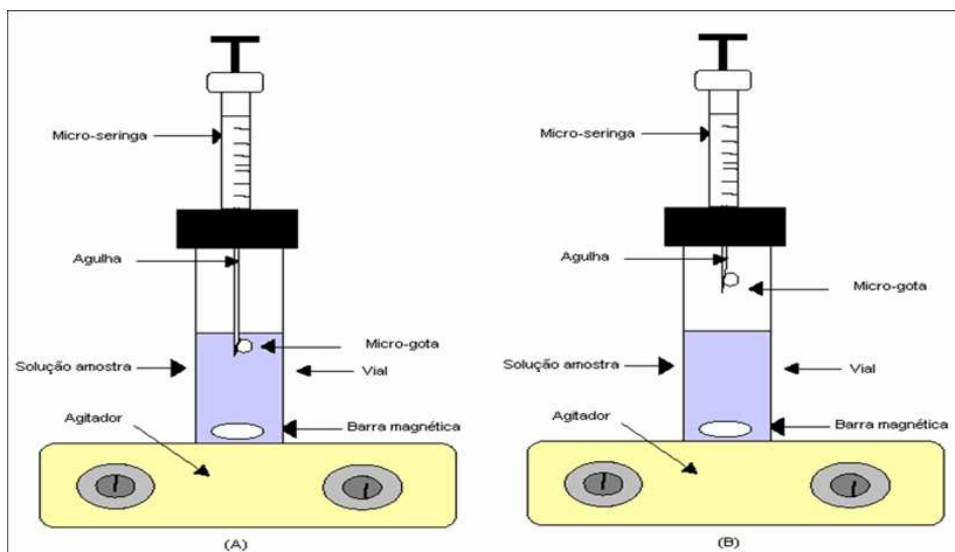
**Tabela 1.1-** Estrutura, classe química e valores máximos permitidos para os oito agrotóxicos em água. (Portaria 2914 de 12/12/2011 do Ministério da Saúde) [14]

Agrotóxico	Estrutura Química	Classe Química	log K <sub>ow</sub> pH = 7 20 °C	Valor Máximo permitido (µg L <sup>-1</sup> )	Solubilidade em água 20-25 °C (mg L <sup>-1</sup> )
Trifluralina (α,α,α-trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropyl-p-toluidine)		Dinitroanilina	5.27	20	0.194
Alaclor (2-Chloro-N-(2,6-diethylphenyl)-N-(methoxymethyl)acetamide)		Cloroacetanilida	3.09	20	148
Lindano (1R,2R,3S,4R,5R,6S)-1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane)		Organoclorado	3.61	2	7.3
Parationa Metílica (O,O-dimethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate)		Organofosforado	3.0	9	55
Endossulfam (6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-methano-2,4,3-benzodioxathiepine-3-oxide)		Organoclorado	4.75	20	0.32
Endrin (1R,2S,2aS,3S,6R,6aR,7R,7aS)-3,4,5,6,9,9-hexachloro-1a,2,2a,3,6,6a,7,7a-octahydro-2,7:3,6-dimethanonaphtho[2,3-b]oxirene)		Organoclorado	5.06	0,6	0.25
Dieldrin (1R,2R,2aS,3S,6R,6aR,7S,7aS)-3,4,5,6,9,9-hexachloro-1a,2,2a,3,6,6a,7,7a-octahydro-2,7:3,6-dimethanonaphtho[2,3-b]oxirene)		Organoclorado	5.37	0,03	0.19
4,4'- DDT 4,4'-(2,2,2-trichloroethane-1,1-diyl)bis(chlorobenzene)		Organoclorado	6.53	1	0.025

Para atender a legislação que se torna cada vez mais exigente, a determinação de resíduos de agrotóxicos em água tem sido prioridade nas pesquisas realizadas principalmente para o desenvolvimento de métodos que apresentem limites de detecção e quantificação cada vez menores.

A técnica de microextração em gota única associada a métodos cromatográficos, tem se destacado nos últimos anos por apresentar limites de detecção e quantificação menores que as técnicas convencionais. O princípio básico da técnica consiste em expor uma gota de solvente orgânico imiscível suspenso na ponta de uma agulha em contato com a amostra líquida sob agitação (Figura 1.1 A). Após um determinado tempo a gota é recolhida e o extrato orgânico levado para análise instrumental. A cromatografia gasosa tem sido muito utilizada devido à sua versatilidade podendo ser empregado diversos tipos de detectores.

Segundo Jeannot, [15] existem diversos modos de extração em gota única, no entanto os dois principais modos de operação são a extração direta e a extração no *headspace*. A Figura 1.1 ilustra os dois modos de extração.



**Figura 1.1-** Desenho esquemático dos principais modos de extração em SDME: (A) modo direto e em (B) *headspace* (FONTE: adaptado de [16])

No modo de extração direta, a gota (fase extratora) é inserida diretamente na matriz da amostra e os analitos são transportados para a fase extratora. A agitação magnética é empregada para acelerar o transporte dos analitos do meio da solução para a vizinhança da gota. [9] No modo *headspace* (HS) (Figura 1.1 B), a gota é suspensa na região sobre a amostra, contida em um frasco de amostragem, onde os analitos são transportados através da barreira de ar antes de atingirem a gota. Este modo de extração pode ser aplicado para a extração de analitos voláteis ou que possam ser volatilizados, por exemplo, pela formação de hidreto no caso de análise

de metais. [13]

Segundo Xu, [9] vários fatores experimentais afetam a eficiência de extração e devem ser otimizados, tais como: escolha do agente complexante (quando aplicado), escolha do solvente extrator, o tempo de extração, o pH da amostra, a agitação da amostra, a força iônica do meio, o volume da amostra e o volume da gota extratora.

O objetivo geral desse trabalho foi desenvolver um método de extração e análise simultânea de 8 agrotóxicos em água utilizando a microextração em gota única no modo direto avaliando os fatores que afetam a eficiência da extração.

## 2-OBJETIVOS

### Objetivo geral

- O objetivo geral desse trabalho foi desenvolver um método de extração e análise para determinação dos princípios ativos trifluralina, alaclor, lindano, parationa métilica, endossulfam, dieldrin, endrin e 4,4'- DDT em água utilizando as técnicas de microextração em gota única (SDME) e cromatografia gasosa.

### Objetivos específicos

- Otimizar o método SDME-CG/DCE para os princípios ativos, avaliando-se parâmetros tais como, solvente extrator, tempo de exposição da gota, velocidade de agitação, temperatura de extração e força iônica.
- Validar o método SDME-CG/DCE para os analitos, determinando as figuras de mérito: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão e fator de enriquecimento.
- Aplicar o método otimizado, validado em amostras de água bruta.

## **3- MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Preparo de soluções-padrão**

Soluções-padrão estoque de cada agrotóxico, na concentração de 1000,0 mg L<sup>-1</sup>, foram preparadas pela solubilização de quantidades adequadas de padrões de trifluralina (99,3% m/m), alaclor (99,0% m/m), lindano (99,8% m/m), parationa metílica (99,9% m/m), endossulfam (91,5% m/m), dieldrin (97,9% m/m), endrin (99,3% m/m), 4,4'- DDT (98,8 % m/m), obtidos da Sigma-Aldrich, em acetonitrila da Sigma/HPLC. Preparou-se soluções de trabalho nas concentrações de 10,0 mg L<sup>-1</sup>, a partir da diluição das soluções-padrão estoque, em acetonitrila. Estas soluções foram armazenadas em freezer (Consul 280) à temperatura de aproximadamente -20 °C.

Para a otimização e validação do método foram utilizadas amostras de água purificada pelo sistema Millipore.

### **3.2. Microextração em gota única (SDME)**

#### **3.2.1. Preparo e fortificação das amostras de água**

Alíquotas de 30,00 mL de água purificada foram adicionadas em frascos de vidro de 35 mL de capacidade. As amostras foram fortificadas em diferentes concentrações com a solução de trabalho (10,0 mg L<sup>-1</sup>) contendo os oito agrotóxicos. As amostras fortificadas foram deixadas em repouso por aproximadamente 1 hora no recipiente aberto.

Posteriormente, estas amostras foram submetidas ao procedimento de extração dos oito agrotóxicos.

### **3.2.2. Extração dos agrotóxicos em água pela microextração em gota única-SDME**

O método de extração SDME direto otimizado e validado consistiu em colocar 30,0 mL de amostra de água fortificada com os agrotóxicos em um frasco de vidro de 35,0 mL com tampa de PTFE e septo de silicone. Neste frasco com 10 centímetros de altura e 2 centímetros de diâmetro, a altura da coluna de água foi de 6,5 centímetros. Uma microsseringa de 10 µL com agulha de aço (701 RN, Hamilton, USA) contendo n-hexano foi introduzida no frasco e a ponta da agulha mergulhada na amostra aquosa em 4,0 centímetros de profundidade. O êmbolo foi empurrado lentamente expondo a microgota na solução. Uma microgota de 1,6 µL foi mantida em contato com a amostra sob agitação de 155 rpm durante 30 minutos a 17 °C. Após a extração a gota foi recolhida e 1,0 µL foi injetado em cromatógrafo a gás (Shimadzu GC-17A) com detector por captura de elétrons (CG-DCE). Antes de cada extração a microsseringa foi lavada com solvente extrator para garantir limpeza completa e eliminação de bolhas de ar.

### **3.3. Otimização da técnica microextração em gota única**

Algumas variáveis foram adaptadas da técnica de microextração em gota única para determinação de agrotóxicos em água do trabalho descrito por Carlos e colaboradores [18] para analisar agrotóxicos em água.

Os fatores avaliados para otimizar a técnica SDME em amostras de água para determinar agrotóxicos foram: velocidade de agitação da amostra (60, 100, 155 e 250 rpm) , volume da microgota exposto na amostra (1,4; 1,6; 2,0 e 2,4 µL), tempo de exposição da microgota (10, 20, 25, 30 e 35 min), solvente extrator (n-hexano e tolueno), presença de sal na amostra (0,0 e 2,0 mol L<sup>-1</sup> de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), temperatura da amostra (17 e 25 °C), sendo que as três últimas variáveis foram avaliadas usando um planejamento fatorial 2<sup>3</sup> enquanto as demais foram avaliadas univariadamente. Os ensaios foram realizados em triplicata. O volume de amostra durante toda a realização do trabalho foi mantido constante e igual a 30, 0 mL e a concentração dos agrotóxicos na otimização foi de 100 µg L<sup>-1</sup>.

### **3.3.1. Avaliação da velocidade de agitação e estabilidade do volume da gota durante a extração**

Para verificar a relação entre a perda de volume da microgota e a velocidade de agitação realizaram-se ensaios em triplicata variando-se a velocidade da agitação magnética e o volume da gota. Os volumes avaliados foram 1,4; 1,6; 2,0 e 2,4  $\mu\text{L}$ . Para cada um desses volumes foram avaliadas velocidades de agitação iguais a 60, 100, 155 e 250 rpm.

### **3.3.2. Avaliação do volume da microgota na resposta cromatográfica**

Amostras de água deionizada foram fortificadas com a solução padrão dos princípios ativos estudados numa concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . Diferentes volumes da microgota (1,4; 1,6; 2,0; 2,4  $\mu\text{L}$ ) foram expostas nessas amostras de acordo com o procedimento descrito no item 3.2.2.

### **3.3.3. Avaliação do tempo de exposição da microgota na amostra na resposta cromatográfica**

Para avaliar o tempo de equilíbrio dos analitos entre a fase orgânica e a fase aquosa, amostras de água deionizada foram fortificadas com a solução padrão dos princípios ativos estudados numa concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . A microgota de 1,6  $\mu\text{L}$  foi exposta em diferentes tempos (10; 20; 25; 30 e 35 min) seguindo o procedimento descrito no item 3.3.2 a fim de verificar se o equilíbrio entre as fases orgânica e aquosa foi estabelecido.

### **3.3.4. Avaliação do solvente extrator, efeito da adição de sal e temperatura na extração dos princípios ativos**

Para avaliar o comportamento simultâneo dos fatores: (1) Adição de sal, (2) solvente extrator e (3) temperatura de extração, sendo realizado um planejamento fatorial  $2^3$ . Para cada um dos fatores foram estudados dois níveis, nível mínimo (-) e nível máximo (+).

Como o experimento envolve três fatores com dois níveis cada um, a execução do planejamento foi realizada em oito ensaios, com todas as possíveis combinações

dos níveis (-) e (+). Cada ensaio foi realizado em duplicata, totalizando dezesseis ensaios (Tabela 1.2).

As demais condições experimentais utilizadas foram aquelas em que se obteve melhores os resultados pela otimização univariada.

**Tabela 1.2-** Planejamento fatorial  $2^3$  para avaliação de três fatores na recuperação de agrotóxicos em água usando a técnica SDME.

Experimentos	Fatores codificados			Fatores originais		
	F(1)	F(2)	F(3)	[H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] (1) (molL <sup>-1</sup> )	Solvente (2)	temperatura (3) °C
1 e 2	-	-	-	0,0	tolueno	17
3 e 4	+	-	-	2,0	tolueno	17
5 e 6	-	+	-	0,0	hexano	17
7 e 8	+	+	-	2,0	hexano	17
9 e 10	-	-	+	0,0	tolueno	25
11 e 12	+	-	+	2,0	tolueno	25
13 e 14	-	+	+	0,0	hexano	25
15 e 16	+	+	+	2,0	hexano	25

### 3.4. Análise cromatográfica

As análises qualitativas e quantitativas dos oito princípios ativos avaliados foram realizadas em cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-17A, com detector por captura de elétrons (DCE).

As condições cromatográficas, programação de aquecimento da coluna cromatográfica, temperaturas do injetor e do detector, modo de injeção, e vazão do gás de arraste foram otimizadas univariadamente.

As determinações foram realizadas visando um tempo reduzido de análise, uma boa resolução e separação dos picos referentes aos agrotóxicos de interesse.

A seguir encontram-se descritas às condições ótimas determinadas:

- Coluna capilar HP-5 da Agilent Technologies, com fase estacionária composta de 5 % de fenilmetilsiloxano e 95 % de dimetilsiloxano, 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,1 µm de espessura de filme.
- Programação de aquecimento da coluna:
- 150 °C (1\*)  $\xrightarrow{40\text{ °C min}^{-1}}$  200 °C (2\*)  $\xrightarrow{5\text{ °C min}^{-1}}$  210 °C (3\*)  $\xrightarrow{3\text{ °C min}^{-1}}$  220 °C  $\xrightarrow{40\text{ °C min}^{-1}}$  290 °C (2\*)
- \* tempo em minutos
- Tempo total de análise: 16 min 30 seg
- Temperatura do injetor: 280 °C

- Temperatura do detector: 300 °C
- Volume injetado: 1,0 µL
- Divisão de fluxo: 1:5
- Gás de arraste: nitrogênio
- Vazão do gás de arraste: 1,2 mL min<sup>-1</sup>

A identificação dos picos cromatográficos de cada composto foi realizada por comparação dos cromatogramas com os de padrões puros em solvente orgânico e a quantificação foi realizada através de curvas de superposição de matriz.

### 3.5. Validação do método analítico

As figuras de mérito avaliadas neste estudo para validação do método microextração em gota única em água e análise de agrotóxicos por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG-DCE) foram seletividade, linearidade do método, limites de detecção e de quantificação, exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária) do método e fator de enriquecimento.

Os procedimentos realizados na validação do método analítico proposto foram baseados nas orientações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária [19], do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, [20] Ribani *et.al*, [21] Brito *et.al*, [22] e Manual de Garantia de Qualidade Analítica. [23]

A Tabela 1.3 apresenta os critérios de aceitação dos coeficientes de variação da reprodutibilidade segundo o Manual de Garantia da Qualidade Analítica de acordo com a faixa de concentração. Em condições de repetitividade o coeficiente de variação deve ser menor que dois terços do valor apresentado na Tabela 1.3

**Tabela 1.3** – Critérios de aceitação da reprodutibilidade segundo o MAPA [23]

Faixa de concentração	Coefficiente de Variação (CV) %
$c < 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	35
$1 \mu\text{g kg}^{-1} \leq c < 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	30
$10 \mu\text{g kg}^{-1} \leq c < 100 \mu\text{g kg}^{-1}$	20
$100 \mu\text{g kg}^{-1} \leq c < 1 \text{mg kg}^{-1}$	15
$1 \text{mg kg}^{-1} \leq c < 10 \text{mg kg}^{-1}$	10
$10 \text{mg kg}^{-1} \leq c < 100 \text{mg kg}^{-1}$	7,3
$100 \text{mg kg}^{-1} \leq c < 1 \text{g kg}^{-1}$	5,3
$1 \text{g kg}^{-1} \leq c < 10 \text{g kg}^{-1}$	3,7
$10 \text{g kg}^{-1} \leq c < 100 \text{g kg}^{-1}$	2,7
$100 \text{g kg}^{-1} \leq c < 1 \text{kg kg}^{-1}$	2,0

### 3.5.1. Seletividade

A seletividade do método analítico foi avaliada comparando-se cromatogramas de extratos da matriz isenta dos agrotóxicos, com cromatogramas do extrato de um branco fortificado com os princípios ativos de interesse. Todos os extratos foram preparados e analisados de acordo com o método otimizado.

Na seletividade do método de análise avaliaram-se as condições cromatográficas que permitiram a separação de todos os picos dos agrotóxicos garantindo assim que não havia sobreposição dos picos referentes aos compostos estudados e também a inexistência de picos de interferentes nos tempos de retenção dos compostos no extrato da matriz isenta de contaminação.

### 3.5.2. Linearidade do método

A linearidade do método foi determinada pela injeção de extratos obtidos de amostras fortificadas em 5 concentrações distintas dos princípios ativos trifluralina (60 a 720,00 ng L<sup>-1</sup>), alaclor (40 a 480,00 ng L<sup>-1</sup>), lindano (20 a 240,00 ng L<sup>-1</sup>), parationa metílica (105 a 1260,00 µg L<sup>-1</sup>), endossulfam (80,00 a 960,00 ng L<sup>-1</sup>), dieldrin (35,00 a 420,00 ng L<sup>-1</sup>), endrin (40,00 a 720,00 ng L<sup>-1</sup>), 4,4'- DDT (100,00 a 1200,00 ng L<sup>-1</sup>) submetidas à técnica de extração otimizada.

Após a análise cromatográfica dos extratos foram construídas curvas analíticas, relacionando-se as áreas dos analitos com as concentrações mencionadas.

A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação obtido pela regressão linear destas curvas e também pela análise do gráfico de resíduos.

### 3.5.3. Limite de detecção e limite de quantificação do método

O limite de detecção (LD) do método proposto foi determinado considerando o valor da área do pico igual a três vezes o sinal da linha de base (ruído) obtido pela injeção e análise por CG-DCE de sete extratos de amostra de água isenta de agrotóxicos. O limite de quantificação (LQ) do método foi determinado considerando o valor igual a dez vezes o sinal da linha de base (ruído) obtido pela injeção e análise por CG-DCE de extrato de amostra de água isenta de agrotóxicos.

Para confirmar os limites de detecção e quantificação do método, extratos

obtidos de matrizes contaminadas pelos agrotóxicos em diferentes concentrações foram injetados até ser observada a relação sinal ruído nas proporções 3:1 para os limites de detecção e 10:1 para o limite de quantificação.

#### 3.5.4. Exatidão

A exatidão do método de SDME proposto foi avaliada por ensaios de recuperação. Nestes, as amostras de água, em triplicata (n=15), foram fortificadas em concentrações iguais a uma, três e cinco vezes os limites de quantificação do método (LQ, 3LQ e 5LQ) e submetidas ao procedimento de extração.

#### 3.5.5. Precisão

A precisão do método foi avaliada pelo estudo da repetitividade e a precisão intermediária. A Tabela 1.4 apresenta as concentrações nas quais as amostras de água foram fortificadas em um nível de concentração (n=7) dentro da faixa de trabalho para os ensaios de repetitividade e precisão intermediária.

**Tabela 1.4-** Concentrações de cada agrotóxico em água para os ensaios de precisão intermediária e repetitividade

Composto	Concentração avaliada para os ensaios de precisão /(ng L <sup>-1</sup> )
Trifluralina	200
Alaclor	300
Lindano	75
Parationa	200
Alfa endossulfam	300
Dieldrin	300
Endrin	75
Beta endossulfam	300
4,4'- DDT	300

##### 3.5.5.1. Repetitividade

A repetitividade foi avaliada pelo preparo, injeção e análise no mesmo dia de sete extratos de amostras de água fortificadas com os oito agrotóxicos, e submetidas à técnica de extração otimizada, em concentrações iguais aos valores mostrados na Tabela 1.4 para cada agrotóxico. Para tal avaliação, determinou-se os coeficientes de variação (CV) referentes à área do analito para cada agrotóxico. [20]

### 3.6.5.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada por meio das áreas dos picos cromatográficos dos agrotóxicos em estudo, e seus respectivos coeficientes de variação, obtidos da análise dos extratos de sete amostras de água fortificadas com os agrotóxicos estudados (Tabela 1.4), e submetidas pela técnica de extração otimizada em três dias diferentes (1º, 5º e 7º dia).

### 3.6. Determinação do fator de enriquecimento

Após otimização do método empregando a técnica de SDME e análise por CG-DCE, a mesma foi empregada na extração e análise de amostras de água pura contendo os agrotóxicos. As amostras foram fortificadas em um nível de concentração que se encontrava dentro da faixa de trabalho. Os ensaios foram realizados em triplicata e as amostras fortificadas nas concentrações mostradas na Tabela 1.5.

**Tabela 1.5-**Concentrações dos agrotóxicos em amostras de água utilizadas para determinação do fator de enriquecimento para cada agrotóxico

Composto	Concentração avaliada (ng L <sup>-1</sup> )
Trifluralina	180
Alaclor	320
Lindano	60
Parationa	315
Alfa endossulfam	400
Dieldrin	280
Endrin	200
Beta endossulfam	400
4,4'- DDT	500

Para as quantificações foi construída uma curva analítica para cada agrotóxico a partir da injeção direta de triplicatas de soluções-padrão dos compostos em solvente orgânico na faixa de concentração de 5 a 100 µg L<sup>-1</sup>. O fator de enriquecimento foi obtido usando a seguinte equação:

$$FE = (C_{sol} * 1000) / C_{fort}$$

Onde: FE: Fator de enriquecimento

C<sub>sol</sub>: concentração obtida pela curva do solvente em µg L<sup>-1</sup>

C<sub>fort</sub>: concentração de fortificação da amostra em ng L<sup>-1</sup>

### 3.7. Análise Estatística

Os dados obtidos foram comparados através da ANOVA com *post-hoc* teste Tukey ao nível de 95% de confiança e teste de Levene utilizando software Statistica® 8 e pelo teste t pareado ao nível de 95% de confiança usando o Microsoft Excel 2010®.

### 3.8. Cinética de transferência dos agrotóxicos da fase aquosa para a fase orgânica

Para estudar o comportamento da transferência de matéria da fase aquosa para a fase orgânica e verificar a cinética de transferência, amostras isentas de contaminação foram contaminadas com os agrotóxicos estudados. O método otimizado e validado foi aplicado variando o tempo de exposição da microgota na amostra (5, 10, 15, 20, 25 e 30 min). A velocidade de agitação foi mantida constante em 155 rpm. Após cada tempo os extratos foram injetados no CG/ECD e as áreas dos picos de cada composto foram avaliadas. Com os dados obtidos aplicou-se os modelos de cinética de primeira e segunda ordem, modelo de difusão intrapartícula e modelo de difusão de Noyes-Whitney a fim de verificar o modelo que melhor explicaria a extração dos analitos para a fase orgânica, e com o melhor modelo foram determinados as constantes cinéticas e concentração de saturação.

### 3.9. Aplicação em amostras de água da região de Viçosa- MG

. A técnica SDME desenvolvida para determinação dos agrotóxicos otimizada e validada, foi aplicada em três amostras de água sendo dois pontos localizados na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, e o outro ponto na BR 482 entre os municípios de Viçosa e Porto Firme, Minas Gerais. A amostra 1 foi coletada no ponto de captação da estação de tratamento de água da cidade, a amostra 2 foi coletada no curso d'água do rio São Bartolomeu em um ponto na saída da cidade e a amostra 3 numa lagoa que recebe dejetos de um estabulo pertencente ao departamento de zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.

Após análise as amostras de água foram fortificadas em 2 níveis de concentração (LQ, 3LQ) para cada um dos compostos estudados e a porcentagem de recuperação relativa foi calculada. A Tabela 1.6 mostra a localização dos pontos onde foram realizadas as coletas.

**Tabela 1.6-** Relação das amostras de água analisadas

Ponto	Coordenadas UTM 23K SAD 69
1	7645714/659933
2	7652240 / 652788
3	7643851 / 661644

A fim de avaliar se a etapa de filtração alterava a recuperação relativa dos analitos a amostra de água 3 foi subdividida em duas novas amostras. A primeira passando pelo procedimento de filtração usando papel de filtro a 0,45  $\mu\text{m}$  para remoção do material particulado e a segunda sem executar o procedimento de filtração da amostra. O método foi então aplicado em ambas amostras conforme descrito no item 3.3.2 e os resultados avaliados.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Otimização do método analítico**

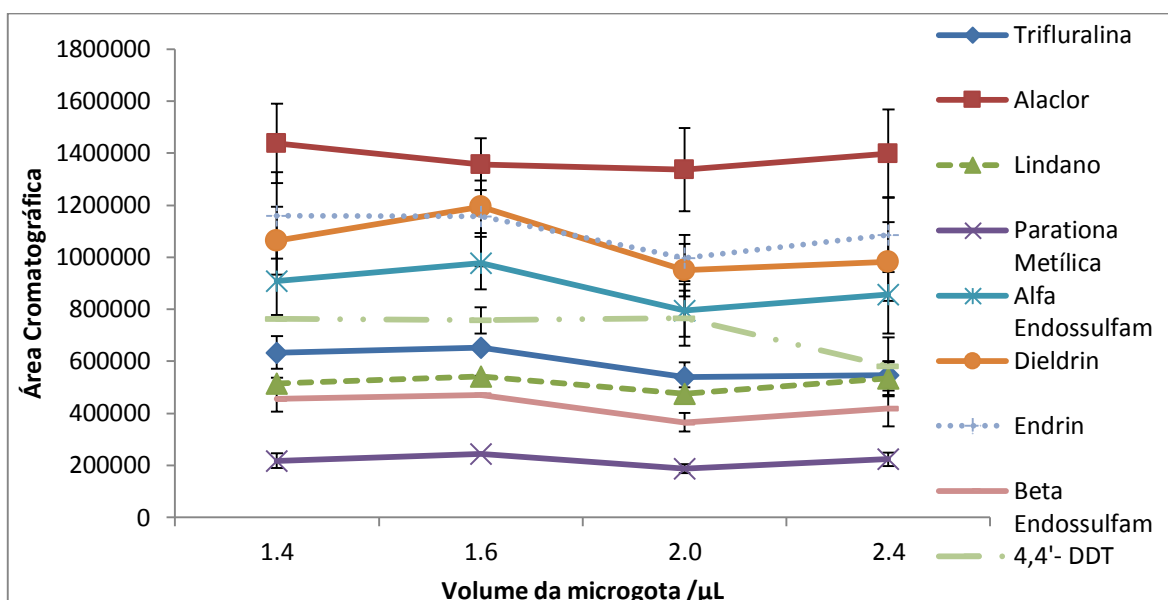
#### **4.1.1. Avaliação da velocidade de agitação e estabilidade do volume da gota durante a extração**

Para verificar a estabilidade do volume da microgota em função da velocidade de agitação realizaram-se ensaios em triplicata variando a velocidade da agitação magnética e o volume da gota. As velocidades de agitação avaliadas foram 60, 100, 155 e 250 rpm para um tempo de exposição da gota de 30 min. Testou-se para cada velocidade quatro volumes de gotas distintos (1,4; 1,6; 2,0 e 2,4  $\mu\text{L}$ ). Para velocidades inferiores a 155 rpm a gota se mostrou estável e o volume recolhido do solvente orgânico foi igual ao volume exposto. Para velocidades maiores que 155 rpm a microgota não permaneceu na extremidade da agulha sendo inviável a utilização das mesmas no intervalo de tempo avaliado.

Optou-se então pela velocidade 155 rpm em todos os outros estudos realizados.

#### **4.1.2. Avaliação do volume da gota na resposta cromatográfica**

Amostras de água deionizada, foram fortificadas com a solução padrão dos princípios ativos estudados numa concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . Diferentes volumes da microgota (1,4; 1,6; 2,0; 2,4  $\mu\text{L}$ ) foram expostas nessas amostras de acordo com o procedimento descrito no item 3.3.2. por um tempo de 30 min para a extração dos compostos. Após o tempo de extração os extratos foram injetados no CG/DCE e as áreas obtidas para cada composto foram comparadas. As áreas de cada um dos compostos foram lançadas em gráficos como mostrado na Figura 1.2.



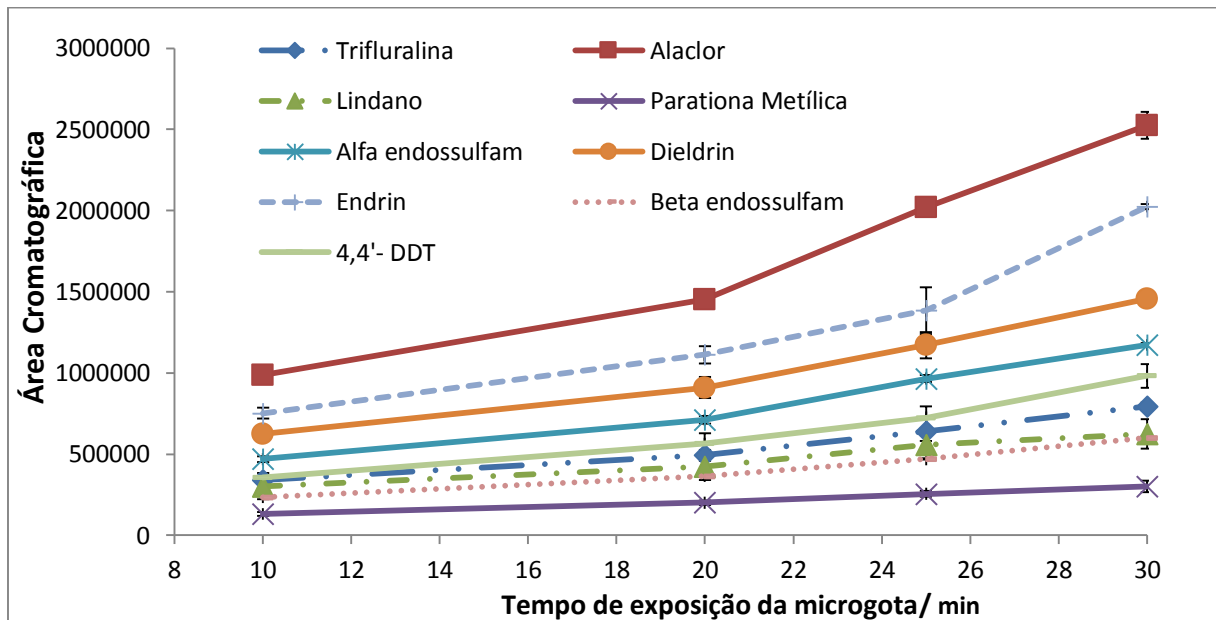
**Figura 1.2-** Variação da área do pico cromatográfico de cada agrotóxico em função do volume de microgota utilizado na extração dos agrotóxicos pela SDME.

Para todos os compostos as áreas cromatográficas obtidas em relação a variação do volume da gota não foram estatisticamente diferentes ao nível de 95% de confiança pela ANOVA. Então fica evidente que variar o volume da gota entre 1,4 e 2,4 µL não altera significativamente a quantidade de analito extraído. Resultados semelhantes foram obtidos por Cortada e colaboradores (2009) [24] e Carlos e colaboradores (2013) [11] que na etapa de otimização do método para extração de agrotóxicos em água usando SDME avaliaram volumes de microgota de 1,0 a 2,2 µL. Para os estudos posteriores o volume de 1,6 µL foi o escolhido uma vez que para este volume as respostas cromatográficas apresentaram menores valores de desvio padrão e além disso o referido volume também foi escolhido por Carlos e colaboradores 2013. [11]

#### 4.1.4. Avaliação do tempo de exposição da gota na amostra na resposta cromatográfica

Para avaliar o tempo de exposição da gota, as amostras de água deionizada foram fortificadas com a solução padrão dos princípios ativos estudados numa concentração de 100 µg L<sup>-1</sup>. Essa concentração foi escolhida para garantir uma boa resposta cromatográfica de cada um dos analitos. A microgota de 1,6 µL foi exposta em diferentes tempos a fim de verificar se o equilíbrio entre as fases orgânica e aquosa foi estabelecido.

Na Figura 1.3 é apresentado a variação da área cromatográfica para todos os princípios ativos e nela observa-se que com o aumento do tempo de contato da microgota com a amostra aquosa aumenta-se a área dos picos cromatográficos, o que evidencia que o equilíbrio químico não foi atingido. Comportamento similar foi observado para todos os compostos avaliados. Esses resultados estão de acordo com os experimentos realizados por Carlos e colaboradores (2013) [11], Cortada e colaboradores (2009) [24] e Ahmadi e colaboradores (2006), [25] que avaliaram o aumento da resposta cromatográfica ao longo do tempo. Cabe ressaltar ainda que em tempos maiores ou iguais a 35 min ocorre perda da microgota na fase aquosa, por isso o maior tempo possível foi de 30 min, escolhido para todos os estudos posteriores.



**Figura 1.3-** Áreas dos picos cromatográficos dos agrotóxicos em função do tempo de exposição da gota em solução aquosa contendo os analito na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ .

#### 4.1.5. Avaliação do solvente extrator, efeito da adição de sal e temperatura na extração dos princípios ativos

A otimização do solvente extrator, adição de sal e temperatura, tendo como resposta a área cromatográfica, foi realizada de acordo com planejamento fatorial completo  $2^3$  em triplicata. Na Figura 1.5 são apresentados os gráficos de Pareto para os efeitos dos fatores sobre a extração dos compostos avaliados.

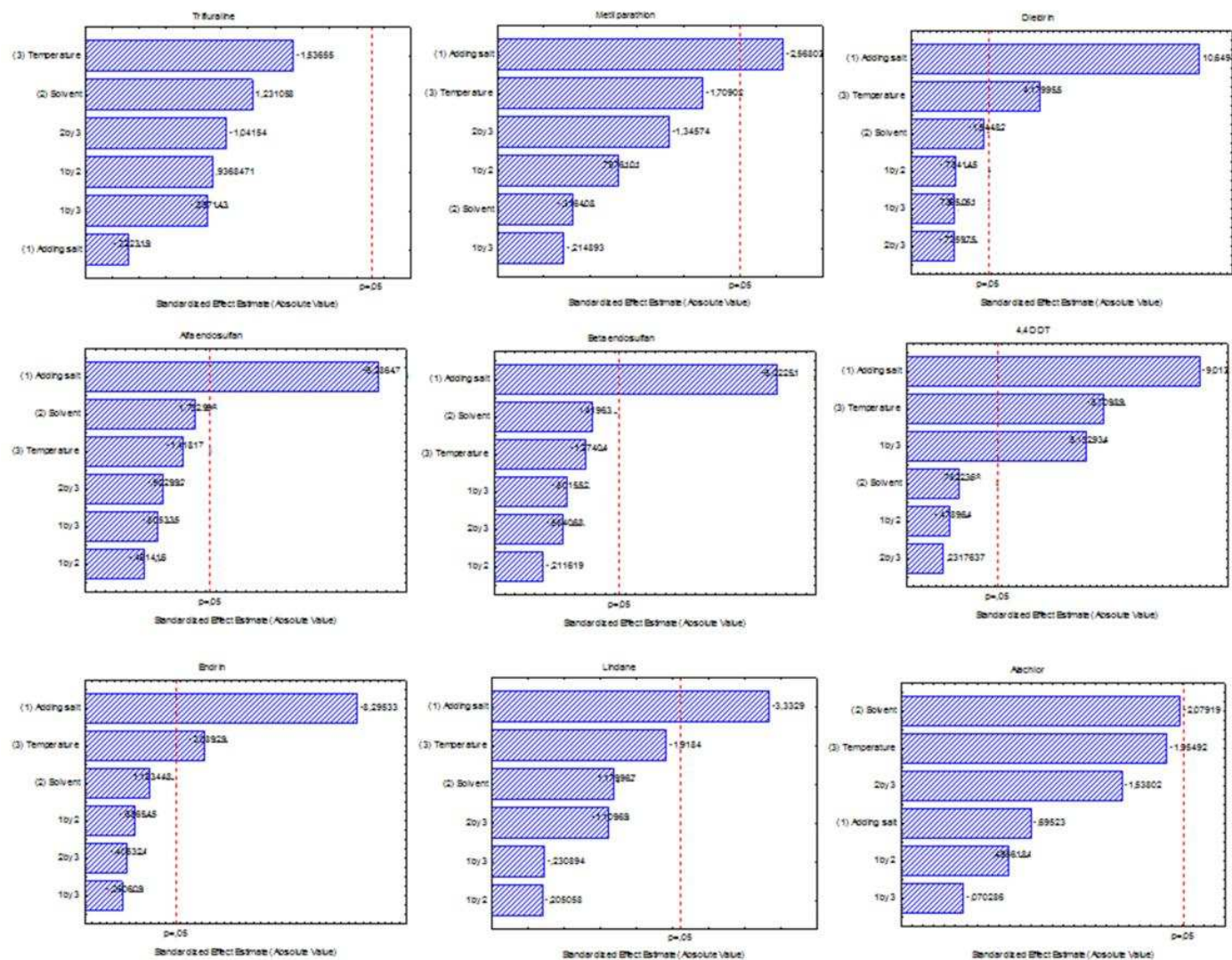


Figura 1.4 - Diagrama de Pareto dos efeitos dos fatores: força iônica, temperatura da amostra e solvente extrator, sobre a extração dos agrotóxicos de amostras de água usando SDME.

Pela análise dos efeitos dos fatores sobre a extração dos agrotóxicos verificou-se que para a maioria dos compostos estudados, que o tipo de solvente extrator não foi significativo para nenhum dos compostos estudados, no entanto, a força iônica, e a temperatura foram significativos ao nível de 95% de confiança ( $\alpha < 0,05$ ). Ou seja, quando se altera a força iônica pela adição de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ocorre uma diminuição na extração dos compostos, o mesmo acontece quando a temperatura da amostra é de 25 °C. Os resultados para adição de sal à amostra estão em conformidade com os dados publicados por Carlos e colaboradores (2013) para análise de organoclorados [11], com os Ahmadi e colaboradores (2006) para análise de organofosforados [25] e com obtidos por Cordata e colaboradores (2009) para análise de organoclorados em água [24].

A adição de sal à amostra geralmente aumenta a extração de compostos polares devido ao aumento da força iônica da solução. No entanto, efeitos adversos foram observados para SDME. Supõe-se que, além de o efeito de "salting-out", a presença de sal provoca alterações nas propriedades físicas da superfície de extração, reduzindo as taxas de difusão do analito para a fase orgânica [11].

No entanto usar como solvente extrator n-hexano ou tolueno não altera a porcentagem de extração dos analitos. A escolha pelo n-hexano foi devido a sua menor toxicidade em relação ao tolueno e também por apresentar uma menor polaridade, o que torna a microgota mais estável em água. Esse resultado está em conformidade com os resultados obtidos por Carlos e colaboradores (2013) [11].

Logo pelos valores críticos, as melhores condições experimentais foram: hexano como solvente extrator, temperatura de extração 17 °C e sem adição de sal.

#### **4.1.6. Método otimizado**

O método de extração com microgota (SDME) otimizado consiste em , colocar 30,00 mL de amostra de água em um frasco de vidro de 35,00 mL com tampa de teflon e septo de silicone. Uma microseringa de 10  $\mu\text{L}$  com agulha de aço (701 RN, Hamilton, USA) contendo 1,6  $\mu\text{L}$  n-hexano é introduzida no frasco e a ponta da agulha mergulhada na amostra aquosa. Posteriormente o êmbolo é empurrado lentamente expondo a microgota, que é mantida em contato com a amostra sob agitação de 155 rpm durante 30 minutos a 17 °C. Após a extração a microgota é recolhida e 1,0  $\mu\text{L}$  é injetado no CG/DCE. Antes de cada extração a microseringa foi lavada com solvente extrator para garantir limpeza completa e eliminação de bolhas de ar.

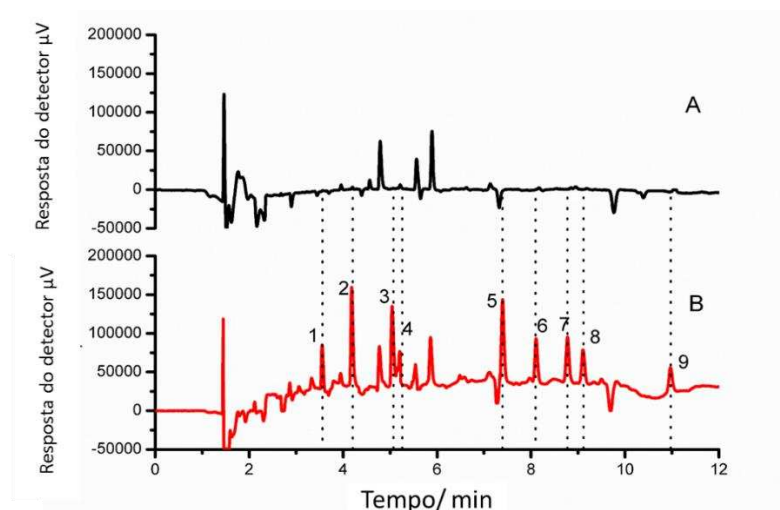
## 4.2. Validação do método analítico

A necessidade de se expor a qualidade de medições químicas, principalmente através de sua confiabilidade, está sendo cada vez mais exigida. Dados analíticos incertos podem conduzir a decisões equivocadas. Portanto, para que um método analítico gere informações seguras e interpretáveis sobre uma amostra, e se torne verdadeiramente confiável, este deve passar por uma avaliação denominada validação.[22]

Determinado método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos. Deve-se avaliar a relação entre os resultados experimentais e as questões que o método se propõe a responder. O objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito [22].

Os parâmetros de validação de métodos analíticos estudados foram Seletividade, Exatidão, Precisão, Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) e fator de enriquecimento.

Para avaliar a seletividade injetou-se um padrão em solvente na concentração de  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  e um extrato da matriz isenta de agrotóxicos e comparou-se a existência de picos no cromatograma do branco da matriz no mesmo tempo de retenção dos compostos de interesse. A Figura 1.5 mostra a sobreposição dos cromatogramas do branco (A) e do padrão em acetonitrila na concentração de  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  dos oito agrotóxicos (B).



**Figura 1.5-** Cromatogramas do extrato do branco de água (A) sobreposto ao do branco fortificado na concentração de  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  (B). Os picos mostrados 1. Trifluralina ( $t_R=3,56$ ), 2. Alaclor ( $t_R=4,20$ ) 3. Lindano ( $t_R=5,07$ ), 4. parationa metílica ( $t_R=5,18$ ), 5. alfa endossulfam ( $t_R=7,45$ ), 6. Dieldrin ( $t_R=8,17$ ), 7 Endrin. ( $t_R=8,85$ ), 8. beta endossulfam ( $t_R=9,19$ ), e 9. 4,4'- DDT ( $t_R=11,06$ ).

Para os métodos cromatográficos a seletividade é avaliada no sentido de garantir que o pico de resposta do analito (avaliado no tempo de retenção característico) seja proveniente exclusivamente do mesmo e não de outros compostos (interferentes) presentes na amostra [26]. De acordo com a Figura 1.6 não existem picos no branco da matriz que coincidem com os tempos de retenção dos compostos mostrando assim que o método é seletivo para os compostos estudados.

Segundo a ANVISA, [27] a linearidade de resposta de um método corresponde à capacidade do mesmo de demonstrar que os resultados obtidos (áreas cromatográficas) são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Assim, o coeficiente de correlação é considerado um parâmetro para avaliar a qualidade da curva analítica e conseqüentemente a linearidade do método. Se este valor for próximo a 1,00, verifica-se pequena dispersão dos pontos experimentais e que menor é a incerteza dos coeficientes. A ANVISA [19] recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO [20] um valor acima de 0,90. Em química analítica, o valor do coeficiente de determinação  $r^2$  tem sido preferido pois seu valor representa a porcentagem da variância explicada. Entretanto, tanto um quanto outro parâmetro tem sido úteis em cada escala. Talvez pela simplicidade do primeiro os órgãos regulamentadores como ANVISA e IMETRO têm optado pelo uso do coeficiente de correlação.

A linearidade de resposta do método foi determinada pela injeção e análise de extratos obtidos de amostras fortificadas em cinco concentrações diferentes em triplicata, dos princípios ativos submetidas ao método otimizado e validado.

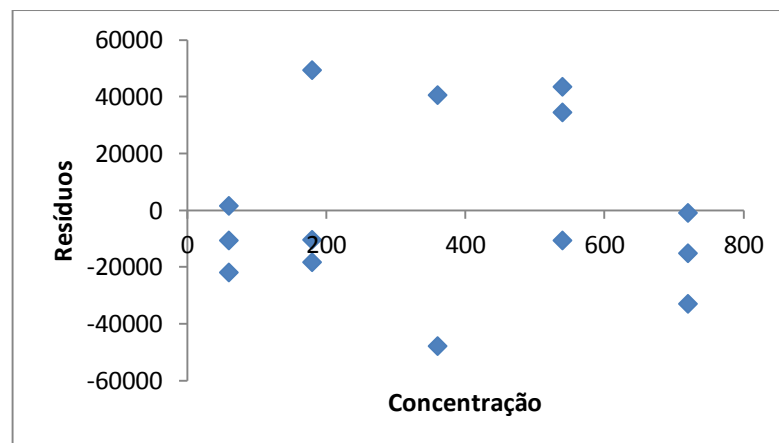
Após análise cromatográfica destes extratos foram construídas curvas analíticas, relacionando as áreas dos analitos com as concentrações, obtendo-se assim as equações de reta e os respectivos coeficientes de correlação. Os modelos obtidos para cada composto assim como os coeficientes de correlação estão dispostos na Tabela 1.7.

**Tabela 1.7-** Equações de regressão linear e os coeficientes de correlação para os oito agrotóxicos na faixa de trabalho estudada

Agrotóxico	Faixa de trabalho (ngL <sup>-1</sup> )	Equação	r
Trifluralina	60 a 720	$y = 967,64x + 23773$	0,992
Alaclor	40 a 480	$y = 1409,4x + 21565$	0,994
Lindano	20 a 240	$y = 3116x + 41657$	0,993
Alfa endossulfam	80 a 960	$y = 1117,9x + 60089$	0,993
Parationa Metílica	105 a 1269	$y = 118,56x - 3440$	0,994
Endrin	40 a 720	$y = 1674,3x + 3050,4$	0,990
Dieldrin	35 a 420	$y = 2385,2x + 64042$	0,985
Beta endossulfam	195 a 960	$y = 581,87x + 1689,8$	0,993
4,4'- DDT	100 a 1200	$y = 1258,4x - 17650$	0,986

Modelos com altos valores de resíduos no sinal analítico ou pontos mal distribuídos ao longo da faixa de calibração poderão fornecer um bom coeficiente de correlação, mesmo que uma função linear não seja a melhor descrição para o comportamento entre as variáveis dependente e independente. Por exemplo, uma equação polinomial pode apresentar um desvio padrão dos resíduos que uma equação linear, o que significaria um melhor ajuste. Para evitar problemas de falta de ajuste durante a modelagem, faz-se necessária a análise cuidadosa do gráfico dos resíduos do sinal analítico [26].

A Figura 1.7 mostra o gráfico de resíduos para o ajuste linear para o agrotóxico 4,4'- DDT, sendo que para os demais compostos estudados observou-se comportamento semelhante. O gráfico de resíduos apresentou distribuição uniforme caracterizando um comportamento homocedástico e portanto, as incertezas obtidas no modelo de regressão são confiáveis. Esse padrão também indica um bom ajuste do modelo aos dados experimentais.



**Figura 1.6** - Gráfico de resíduos para o ajuste linear para as respostas cromatográficas do princípio ativo 4,4'-DDT

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis de concentração do analito, como é o caso da análise de resíduos, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectada pelo método. [20] O limite de detecção (LD) pode ser determinado mediante a relação sinal/ruído, o desvio-padrão da resposta e da inclinação.

. A determinação da razão sinal/ruído foi realizada por meio da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o mesmo pode ser detectado. É importante lembrar que o método de determinação sinal/ruído pode ser aplicado somente para processos analíticos que exibem linha de base e que a relação sinal/ruído 3:1 e 10:1 são as proporções aceitas como estimativas do limite de detecção e do limite de quantificação, respectivamente. [21, 22]

Os valores encontrados para os limites de detecção e quantificação para o método microextração em gota única para amostras de água assim como os limites máximos de resíduos estabelecidos pelo Ministério da Saúde são mostrados na Tabela 1.8.

**Tabela 1.8.** Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) do método SDME e o valor máximo permitido para os agrotóxicos estudados em amostra de água estabelecido pelo Ministério da Saúde

Agrotóxico	LD (ng L <sup>-1</sup> )	LQ (ng L <sup>-1</sup> )	LMR* (ng L <sup>-1</sup> )
Trifluralina	17,8	58,8	20000
Alaclor	11,5	37,8	20000
Lindano	5,9	19,5	2000
Alfa endossulfam	24,0	79,5	20000
Parationa Metílica	32,0	105,6	9000
Endrin	12,4	40,8	600
Dieldrin	10,1	33,2	30
Beta endossulfam	58,9	194,3	20000
4,4'- DDT	30,4	100,0	1000

\*Portaria 2914 de 12/12/2011 do Ministério da Saúde

De acordo com os valores apresentados na Tabela 1.8 o método apresenta valores de limites de detecção mais de 250 vezes menores que os limites máximos exigidos pela legislação, com exceção do composto dieldrin.

Valores maiores para os limites de quantificação foram encontrados por Carlos e colaboradores (2013) para os compostos endrin (50 ng L<sup>-1</sup>) e lindano (30 ng L<sup>-1</sup>) em água [11]. Enquanto para o dieldrin o valor encontrado neste trabalho foi superior ao encontrado no método proposto por Carlos (2013) (10 ng L<sup>-1</sup>) [11] e menor que o proposto por Cortada e colaboradores (2009) (74 ng L<sup>-1</sup>) [24] também em água. Para

o composto parationa metílica foram encontrados valores menores do que os encontrados por Pinheiro e colaboradores (2009) que foi de  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  em água [28]. Para os compostos alfa-endossulfam, beta-endossulfam, 4,4'-DDT e endrin os valores para os limites de quantificação encontrados no presente trabalho foram menores que os encontrados por Cortada e colaboradores (2009) que foram respectivamente 213, 237, 337 e  $227 \text{ ng L}^{-1}$  respectivamente. [24]

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo, ou seja, é definida como a proporção da quantidade de analito, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é passível de ser extraída e quantificada. [21]

Nos ensaios de recuperação os agrotóxicos foram adicionados em amostras de água em concentrações iguais a uma, três e cinco vezes o limite de quantificação do método. Desta forma, os experimentos foram realizados em triplicata conforme o método otimizado. As porcentagens de extração relativa do método para os 3 níveis de concentração variaram entre 90,5 e 122,7 % conforme apresentado na Tabela 1.9. É importante ressaltar que a curva usada para quantificar as porcentagens de extração foi a de superposição de matriz. As faixas de porcentagens de extração encontrados por Carlos e colaboradores (2013), [11] Pinheiro e colaboradores (2009) [28] e Ahmadi e colaboradores (2006) [25] foram de 70 a 125%; 73 a 104% e 90 a 102% respectivamente, mostrando que os resultados obtidos estão em concordância com os dados encontrados na literatura.

**Tabela 1.9-** Porcentagens de recuperação média obtida pela análise de extratos de amostra de água fortificada com os agrotóxicos em três níveis de concentrações diferentes

Agrotóxico	Concentração (ng L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	CV (%)
Trifluralina	60	92,5	6,2
	180	104,1	14,5
	300	101,7	13,5
Alaclor	40	103,1	21,8
	120	107,4	12,0
	200	93,5	7,9
Lindano	20	95,7	9,0
	60	106,1	12,2
	100	96,2	8,9
Parationa Metílica	105	105,7	14,2
	315	98,6	12,0
	525	90,5	12,1
Alfa- endossulfam	80	122,7	21,3
	240	98,5	17,2
	400	90,7	9,5
Dieldrin	35	97,2	30,2
	105	95,1	21,9
	175	89,5	11,4
Endrin	40	99,4	20,8
	120	98,4	20,6
	200	96,7	8,12
Beta endossulfam	195	115,3	23,4
	585	93,7	27,9
	975	90,4	7,8
4,4'- DDT	100	96,5	18,7
	300	94,3	28,2
	500	92,3	9,6

De acordo com o Manual de Garantia da Qualidade Analítica (MAPA) [23] para níveis de concentração inferiores a 1 µg L<sup>-1</sup> são aceitáveis porcentagens de recuperação na faixa de 50 e 120% com coeficientes de variação de até 35%. Como os níveis de concentração avaliados estão abaixo de 1 µg L<sup>-1</sup> os resultados mostrados

na Tabela 1.10 estão em conformidade com as exigências do MAPA [27] sendo então as recuperações aceitáveis segundo esse critério.

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. [27]

A repetitividade do método SDME dos oito agrotóxicos e em amostras de água foi estudada pelo cálculo da estimativa do coeficiente de variação de sete repetições independentes ( $n=7$ ) utilizando a metodologia otimizada, ou seja, pelo preparo, injeção e análise no mesmo dia de sete extratos de amostras de água fortificadas pelos agrotóxicos, em concentrações iguais aos valores mostrados na Tabela 1.4 para cada agrotóxico.

**Tabela 1.10-** Área média dos analitos e coeficientes de variação (CV) obtidos para análise dos sete extratos obtidos de amostras de água fortificadas com os agrotóxicos

Agrotóxico	Concentração (ng L <sup>-1</sup> )	Área média do analito	Coeficiente de variação (%)
Trifluralina	200	174104	22,9
Alaclor	300	158439	20,6
Lindano	75	87120	20,1
Parationa Metílica	200	79979	22,8
Alfa endossulfam	300	342143	17,9
Dieldrin	300	463013	17,3
Endrin	75	91268	15,3
Beta endossulfam	300	144930	20,5
4,4'- DDT	300	194154	21,6

Esses resultados indicam boa repetitividade do método uma vez que para o nível de concentração estudado ( $< 1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) são aceitos coeficientes de variação menores que dois terços do coeficiente de variação estabelecido para a reprodutividade que nessa faixa de concentração avaliada é de 35%. Então, de acordo com o MAPA para o ensaios de repetitividade são aceitos coeficientes de variação menores que 23,3 % [23].

A precisão intermediária é o outro parâmetro utilizado para se determinar a precisão de um método e se refere à precisão avaliada sobre a mesma amostra, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo a(s) condição(ões) a variar, tais como: diferentes analistas, equipamentos ou tempos [20].

Ela foi verificada pelas áreas dos analitos e seus respectivos coeficientes de variação, obtidos pelo preparo, injeção e análise dos extratos de amostras de água fortificadas pelos agrotóxicos, e submetidas à técnica de extração otimizada em

concentrações iguais aos valores mostrados na Tabela 1.5 para cada agrotóxico, em três dias diferentes (1º, 3º e 7º dia) e em sete repetições independentes por dia. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1.11.

**Tabela 1.11-** Valores de áreas médias e coeficientes de variação (CV) obtidos pela análise de extratos obtidos de amostra de água fortificada com os agrotóxicos, nas concentrações apresentadas na Tabela 1.4 em três dias diferentes

Agrotóxico	Área 1º dia	Área 5º dia	Área 7º dia	Média	CV (%) (n=21)
Trifluralina	164033,0	174104,0	144165,6	160767,5	19,8
Alaclor	161438,6	158439,3	128263,3	149380,4	22,7
Lindano	92267,3	81844,0	71790,0	81967,1	22,9
Parationa Metílica	91064,3	79979,7	72393,6	81145,9	21,6
Alfa Endossulfam	334219,1	342143,0	279221,1	318527,8	21,8
Dieldrin	493946,6	463013,6	387648,4	448202,9	21,1
Endrin	98608,43	85743,29	91718,33	92023,35	22,0
Beta endossulfam	144451,1	144930,7	115434	134938,6	19,7
4,4'- DDT	166989,4	181748,4	144591,5	164443,1	22,4

O método apresenta boa precisão intermediária de acordo com as orientações do MAPA [23] uma vez que os valores para os coeficientes de variação para os ensaios em dias diferentes são menores que 23% para todos os agrotóxicos analisados.

Para a determinação do fator de enriquecimento construiu-se curvas no solvente na faixa de concentração entre 5 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  para cada agrotóxico avaliado e calculou-se a concentração para cada amostra. Os fatores de enriquecimento obtidos para os compostos variaram principalmente entre 42 e 64 conforme mostrado na Tabela 1.12. Os valores mais baixos foram observados para o alaclor (17) e parationa metílica (22), enquanto um valor muito elevado foi observado para o lindano (448) indicando uma baixa afinidade do mesmo pela fase aquosa. Esse comportamento do mesmo pode ser explicado, se comparado aos demais compostos avaliados, pela sua pequena massa molar, ausência de átomos de oxigênio ou de outros grupos polares suficientes para uma solvatação adequada pela água que parecem existir em maior quantidade nos demais analitos.

**Tabela 1.12-** Fator de enriquecimento para cada um dos princípios ativos avaliados

Composto	Fator de enriquecimento
Trifluralina	48
Alaclor	17
Lindano	448
Parationa	22
Alfa endo	54
Dieldrin	53
Endrin	64
Beta endo	51
4,4'- DDT	42

Os valores apresentados na Tabela 1.12 confirmam que o método apresenta elevado fator de enriquecimento comprovando assim a pré-concentração do método.

#### 4.7 Cinética de transferência dos agrotóxicos da fase aquosa para a fase orgânica

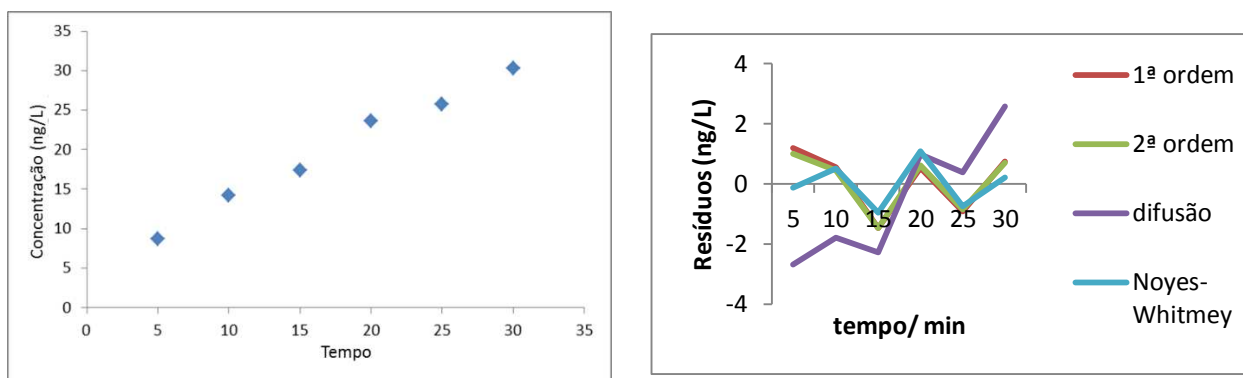
Os modelos cinéticos de primeira ordem, segunda ordem, difusão intrapartícula e o de difusão de Noyes-Whitney foram aplicados aos dados para avaliar qual o melhor modelo explicaria a transferência de matéria dos analitos da amostra aquosa para a microgota de n-hexano, como exemplificado para o princípio ativo lindano na Tabela 1.13.

**Tabela 1.13-** Equações dos modelos obtidos, coeficientes de determinação ( $r^2$ ), desvio padrão dos resíduos ( $S_{res}$ ) e valores da constante cinética ( $k$ ) para os modelos estudados para o agrotóxico lindano

Modelo	Equação	$r^2$	$S_{res}$ (ng L <sup>-1</sup> )	$k$ / min <sup>-1</sup>
Primeira ordem	$Y = 43,9(1 - e^{-kt})$	0,97834	1,18	0,03734
Segunda ordem	$Y = 69,485t / (0,0144k^{-1} + t)$	0,98072	1,11	0,000357
Difusão intrapartícula	$Y = 5,071 t^{0,5}$	0,92801	2,41	-
Noyes-Whitney	$Y = 75,977 - (72,517) e^{-kt}$	0,9846	0,86	0,01528

Para a avaliação do ajuste dos modelos foram usados os parâmetros coeficientes de determinação e desvio padrão dos resíduos ( $S_{res}$ ) e o gráfico de resíduos gerados de cada modelo cinético de cada agrotóxico. Os dados obtidos para o agrotóxico lindano (Figura 1.7) são apresentados como exemplo do comportamento de todos os agrotóxicos. Observou-se que o modelo de Noyes-Whitney apresentou o melhor ajuste para todos os compostos, devido ao maior valor de coeficiente de

determinação ( $R^2$ ) e ao menor valor do desvio padrão dos resíduos. O gráfico da análise de resíduos mostrou a menor dispersão dos resíduos comparados aos outros modelos. Entretanto os dados obtidos para os compostos alaclor, dieldrin e 4,4'- DDT não se ajustaram a nenhum dos modelos avaliados.



**Figura 1.7.** Diagrama de distribuição dos pontos no estudo cinético e dos resíduos dos diferentes modelos cinéticos para o lindano.

Na Tabela 1.14 estão representados os resultados para as constantes de velocidades de transferência ( $k$ ), de cada um dos agrotóxicos, a concentração de saturação e o valor de  $r^2$  para cada um dos agrotóxicos.

**Tabela 1.14** - Parâmetros obtidos da cinética de transferência de matéria pelo modelo de Noyes- Whitney para agrotóxicos em SDME

Composto	Concentração Saturação/ng L <sup>-1</sup>	$k/ \text{min}^{-1}$	$r^2$
Trifluralina	69,71	0,0161	0,9897
Lindano	75,98	0,0153	0,9846
$\alpha$ - endossulfam	23,04	0,0321	0,9531
Parationa Metílica	39,98	0,0418	0,9624
Endrin	22,125	$1,99 \times 10^{-5}$	0,9457
$\beta$ - endossulfam	253,52	0,00716	0,9853

A constante cinética  $k$  mais elevada para a parationa metílica do que para os demais agrotóxicos mostra uma maior taxa de transferência

É válido ressaltar que existe uma relação inversa entre a constante cinética e a concentração de saturação na microgota, ou seja, quanto maior a velocidade de transferência do analito para a fase orgânica menor sua concentração de saturação. A concentração de saturação é definida como o valor teórico máximo de concentração do analito que estaria na gota, caso o sistema atinja o equilíbrio.

A constante cinética observada para o Endrin foi excepcionalmente menor, comparada aos demais, assim como sua concentração no equilíbrio é muito maior.

Todos os parâmetros mostrados na Tabela 1.14 foram obtidos com o auxílio do software origin 8.0.

#### **4.7 Aplicação em amostras de água da região de Viçosa- MG**

A técnica SDME otimizada e validada foi aplicada em três amostras de água. Os resultados para as amostras de água mostraram que em nenhuma das amostras foram encontrados picos nos tempos de retenção dos compostos avaliados. Assim para comprovar a eficiência do método fortificou-se as amostras em 2 níveis de concentração (LQ e 3LQ) e aplicou-se o procedimento. Os ensaios para cada amostra em cada nível foram realizados em triplicatas. As porcentagens de recuperação relativa variaram na maioria entre 72,9 e 115,2 % com valores extremos para o beta endossulfam (50,5%) e para o dieldrin (148%) conforme os resultados mostrados na Tabela 1.15. Para essa determinação foi usada uma curva analítica com método de superposição de matriz. É válido ressaltar que para apenas o dieldrin nas amostras 1 e 3 os valores estão fora da faixa recomendada pelo MAPA que seria porcentagens de recuperação de 50 a 120% para os níveis de concentração avaliados.

**Tabela 1.15-** Porcentagem de recuperação relativa para amostras fortificadas de água

Composto	Fort.* (ng L <sup>-1</sup> )	Água 1 (% rec**. $\pm$ RSD***)	Água 2 (% rec**. $\pm$ RSD***)	Água 3 (% rec**. $\pm$ RSD***)
Trifluralina	60	88,7 $\pm$ 4,0	86,2 $\pm$ 2,3	86,5 $\pm$ 9,4
	180	87,0 $\pm$ 9,1	85,8 $\pm$ 0,8	116,5 $\pm$ 3,8
Alaclor	40	100 $\pm$ 6,0	85,0 $\pm$ 1,0	98,1 $\pm$ 1,3
	120	105 $\pm$ 1,5	111 $\pm$ 0,1	112,5 $\pm$ 1,5
Lindano	20	91,0 $\pm$ 7,5	100,8 $\pm$ 16,2	105,4 $\pm$ 6,1
	60	81,1 $\pm$ 3,7	67,9 $\pm$ 10,6	98,8 $\pm$ 13,0
Parationa Metílica	105	101 $\pm$ 12	107,4 $\pm$ 14,2	104,9 $\pm$ 1,8
	315	88,1 $\pm$ 10,6	84,5 $\pm$ 5,2	107,8 $\pm$ 4,8
Alfa endossulfam	80	80,1 $\pm$ 13,8	92,2 $\pm$ 16,6	115,2 $\pm$ 0,1
	240	70,2 $\pm$ 4,3	72,9 $\pm$ 4,8	77,1 $\pm$ 10,4
Dieldrin	35	147 $\pm$ 24	108,1 $\pm$ 12,1	103,0 $\pm$ 11,2
	105	103 $\pm$ 12	99,8 $\pm$ 5,8	148,3 $\pm$ 12,1
Endrin	40	88,7 $\pm$ 4,2	89,1 $\pm$ 6,3	98,2 $\pm$ 2,3
	120	106 $\pm$ 1,7	76,8 $\pm$ 7,1	93,4 $\pm$ 19,6
Beta endossulfam	80	81,1 $\pm$ 10,6	82,3 $\pm$ 2,8	57,5 $\pm$ 9,6
	240	52,5 $\pm$ 9,3	84,2 $\pm$ 3,2	57,3 $\pm$ 13,9
4,4'- DDT	100	93,3 $\pm$ 0,8	72,0 $\pm$ 0,5	85,6 $\pm$ 1,7
	300	85,7 $\pm$ 4,2	83,3 $\pm$ 13,1	96,2 $\pm$ 5,9

\*Fortificação\*\* % rec. (porcentagem de recuperação relativa) \*\*\*RSD (desvio padrão relativo),

Avaliou-se através do teste t *pareado* ao nível de 95% de confiança se as recuperações relativas para os níveis de concentração estudados apresentavam diferenças significativas entre si. Apenas o composto alaclor na amostra de água 2 e o dieldrin na amostra de água 3 apresentaram diferença significativa para os níveis de concentração avaliados.

Para avaliar a influência da etapa de filtração na recuperação relativa dos analitos uma parte da amostra de água 3 foi filtrada e fortificada em 2 níveis de concentração (LQ e 3LQ) para cada um dos agrotóxicos, enquanto outra parte foi apenas fortificada nas mesmas concentrações descritas. O método foi aplicado e as recuperações relativas calculadas usando a curva de superposição de matriz. Os resultados foram avaliados através de uma ANOVA a fim de verificar se a etapa de filtração alteravam significativamente as porcentagens de recuperação relativa. Somente para os compostos lindano e dieldrin filtrar ou não a amostra altera significativamente as recuperações, sendo que para as amostras não filtradas as recuperações relativas são maiores.

## 5. CONCLUSÃO

A microextração em gota única associada à cromatografia gasosa permitiu o desenvolvimento de um método para análise multirresíduos de agrotóxicos em água.

O método desenvolvido apresenta baixo custo e poucas etapas de manipulação quando comparado a outras técnicas de extração como por exemplo a SPE onde os cartuchos utilizados para a extração são caros, além de apresentar muitas etapas de manipulação da amostra.

Outra vantagem é a redução drástica do volume de solvente orgânico utilizado (1,6  $\mu\text{L}$ ) chegando a ser mais de 250 vezes menor que outros métodos de microextração usados para determinação de resíduos de agrotóxicos em água, como por exemplo a microextração líquido-líquido dispersiva.

O método se mostrou linear, seletivo, preciso, exato e com um elevado fator de enriquecimento para todos os agrotóxicos avaliados. É válido ressaltar que os limites de detecção e quantificação encontrados são da mesma ordem e/ou menores que os encontrados na literatura em trabalhos similares, sendo estes na ordem de  $\text{ng L}^{-1}$ .

Amostras de água bruta coletadas na região do município de Viçosa, MG, foram submetidas ao método proposto não sendo detectado nenhum dos 8 analitos de interesse. Como o LD para cada composto é menor do que o respectivo LMR estabelecido pela Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde, pode-se concluir que as amostras analisadas atenderam ao padrão estabelecido pela legislação com relação aos compostos considerados neste estudo.

As amostras de água bruta foram fortificadas e apresentaram porcentagens de extração dentro da faixa estabelecida pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, exceto para o dieldrin nas amostras coletadas na lagoa da UFV que recebe dejetos do Departamento de Zootecnia e no rio São Bartolomeu, sugerindo assim um possível efeito de matriz para esse composto nessas amostras.

Além disso, ao se analisar tanto essas amostras na sua forma bruta ou filtrada concluiu-se que a porcentagem de recuperação relativa dos compostos não é afetada pela etapa de filtração exceto os compostos dieldrin e lindano.

## **Capítulo 2 – Hifenação das técnicas extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura com a microextração em gota única para a determinação de resíduos de agrotóxico em solo**

### **1- INTRODUÇÃO**

Os agrotóxicos são amplamente utilizados nos agro ecossistemas. Mais de 500 formulações estão disponíveis para uso no controle de pragas. Estima-se que menos de 50 % da quantidade aplicada nas plantações atinge a praga alvo, o restante chega ao ambiente contaminando seus diversos compartimentos como, por exemplo, o solo que atua como principal receptor e acumulador. [29]

Ao atingir o solo esses compostos podem interagir com as diferentes fases do mesmo ocorrendo processos que envolvem transformações químicas, físicas e biológicas, tendo como consequência a degradação total do composto, que pode demorar muito tempo, ou sua conversão em subprodutos mais ou menos tóxicos que o produto original.

Dessa forma o solo funciona como um filtro ativo onde os compostos são degradados e como um filtro seletivo devido a sua capacidade de reter os produtos químicos evitando sua infiltração nos aquíferos. [26]

Devido a essas características o monitoramento das possíveis contaminações do solo oriundas dos agrotóxicos tornou-se um assunto de relevância, necessitando assim, de métodos capazes de extrair e quantificar esses compostos em níveis cada vez menores.

A extração de resíduos de agrotóxicos em solo geralmente requer o uso de técnicas eficientes que sejam capazes de extrair os compostos do mesmo e que sejam transferidos para uma fase normalmente orgânica. A determinação de agrotóxicos em amostras complexas tem uma série de obstáculos como por exemplo, a baixa concentração dessas substâncias nas amostras. Outro problema são as diferentes interações entre as moléculas do analito e os colóides do solo. Essas interações

podem ser fracas ou fortes e dependem das propriedades do próprio solo como pH, textura e mineralogia, teor de matéria orgânica. [30]

Com isso as técnicas de extração normalmente necessitam de etapas de agitação mecânica e etapas de *clean up*. As técnicas de extração usadas atualmente são eficientes para essa determinação, mas fazem uso de quantidade elevada de solvente orgânico e um número elevado de etapas.

Em 2003, Goulart desenvolveu um método simples para análise de piretróides em leite sem etapas de *clean up*, denominada extração líquido-líquido e purificação por precipitação a baixa temperatura. [31]

A partir de então o método proposto foi adaptada para as mais diversas matrizes como extração de piretróides em amostras de água e solo, análise simultânea dos inseticidas em batatas [32] e de agrotóxicos em maçã, [33] abacaxi, [34] tomate, [35] uva, [36] alface, [37] morango, [38], entre outras.

O método consiste em colocar a amostra líquida ou sólida em contato com um solvente extrator, miscível em água, menos denso que ela e que se mantenha líquido a -20 °C. Posteriormente, a mistura, constituída de amostra e mistura extratora é agitada e levada ao freezer por um período pré-estabelecido para separação das fases. Nesta etapa, a fase aquosa junto com a amostra é congelada, ficando na parte inferior e a fase sobrenadante, contendo o solvente e os agrotóxicos extraídos, que é separada e filtrada, utilizando sulfato de sódio anidro para eliminar a possível presença residual de água. Finalmente, a amostra é analisada por cromatografia gasosa.

A desvantagem dessa técnica é que ela promove a diluição da amostra uma vez que na maioria dos casos a proporção amostra/ fase extratora é de 1:2 e com isso os limites de detecção e quantificação não atingem valores muito baixos.

Uma alternativa para contornar essa limitação seria o uso de microtécnicas de extração que fazem uso de quantidades muito pequena de solvente extrator como a microextração em gota única, porém, as mesmas não são adequadas para amostras sólidas. Nesse caso, a hifenação de duas técnicas, sendo uma de extração e *clean up* e outra de pré-concentração, proporcionando melhores fatores de concentração, surge como opção para o processo de extração de analitos nesse tipo de amostras. A hifenação de duas técnicas de extração já estabelecida e foi relatada por Gerecke e colaboradores em 2001 para a determinação de feniluréia em amostras de água combinando SPE com SPME. [39]

Para amostras sólidas existem poucos estudos e não existe relato na literatura

de hifenção de técnicas usando ESL/PBT e SDME. Então com o objetivo de contornar essas limitações, nesse trabalho procurou-se desenvolver um novo método para determinação de agrotóxicos em solo que consistiu na hifenção das técnicas extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura, que tem como característica fundamental a etapa de *clean up* da amostra acoplada ao procedimento de extração com a microextração em gota única, que faz uso de, quantidade mínima de solvente orgânico além de aliar extração e detecção em um aparato simples.

## 2-OBJETIVOS

### Objetivos gerais

- Desenvolver um método combinando as técnicas extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) e a microextração em gota única (SDME) para a extração e análise dos princípios ativos trifluralina, alaclor, lindano, parationa métilica, dieldrin, endrin e 4,4'- DDT em solos por cromatografia gasosa e detector por captura de elétrons.

### Objetivos específicos

- Otimizar o método de extração SLE/LTP para os princípios ativos em solo, avaliando-se parâmetros tais como, solvente extrator, tempo de congelamento e tipo de agitação.
- Otimizar a associação da técnica de extração SLE/LTP com o técnica SDME para a extração dos compostos estudados em solo.
- Validar o método proposto para os analitos, determinando os parâmetros: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão intermediária, exatidão e fator de enriquecimento.
- Aplicar o método hifenado em amostras de diferentes solos.

## **3- MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Preparo de soluções-padrão**

Soluções-padrão estoque de cada agrotóxico, na concentração de 1000,0 mg L<sup>-1</sup>, foram preparadas pela solubilização de padrões de trifluralina (99,3% m/m), alaclor (99,0% m/m), lindano (99,8% m/m), parationa metílica (99,9% m/m), dieldrin (97,9% m/m), endrin (99,3% m/m), 4,4'- DDT (98,8 % m/m), obtidos da Sigma-Aldrich, em acetonitrila da HPLC/ Sigma. Preparou-se soluções de trabalho nas concentrações de 10,0 mg L<sup>-1</sup>, a partir da diluição das soluções-padrão estoque, em acetonitrila que foram preparadas e armazenados conforme descrito no capítulo 1.

### **3.2. Amostras de solo**

Para a otimização e validação do método foram utilizadas amostras de argissolo Vermelho-Amarelo, cujo local de origem é o vale da agronomia na Universidade Federal de Viçosa em Viçosa-MG. As amostras de solo foram coletadas a uma profundidade de 0 – 20 cm. Após as coletas as amostras foram secas ao ar, destorroadas e peneiradas em malha de 2 mm.

### **3.3. Combinação das técnicas extração sólido líquido com partição em baixa temperatura com a microextração em gota única**

#### **3.3.1. Preparo e fortificação das amostras solo**

Amostras de solo de massa igual a 4,0000 g foram transferidas para frascos de vidro de 22,0 mL de capacidade, e fortificadas com 80,0 µL da solução de trabalho (10 mg L<sup>-1</sup>) contendo os sete agrotóxicos. As amostras fortificadas foram deixadas em repouso por aproximadamente 2 horas em recipiente aberto, para que houvesse maior interação dos agrotóxicos com a amostra e para a evaporação do solvente. Posteriormente, estas amostras foram submetidas aos procedimentos de extração dos sete agrotóxicos avaliados.

### 3.3.2. Extração dos agrotóxicos em solo

O método de extração consiste em colocar 4,0000 g de amostra de solo em contato com um volume de mistura extratora (4,0 mL de água, 6,5 ml de acetonitrila e 1,5 mL de acetato de etila) na proporção de aproximadamente 1:2 fase aquosa/ fase orgânica. A mistura foi homogeneizada e colocada no freezer a -20 °C por um tempo não inferior a 3 horas e não superior a 24 horas. Após a separação de fases pelo congelamento do solo e da fase aquosa, o sobrenadante, contendo os solventes orgânicos e os analitos de interesse foi passado por um funil de vidro contendo papel de filtro para a remoção de qualquer possível material particulado que tenha permanecido na fase orgânica durante o procedimento de extração. A fase orgânica foi então evaporada em evaporador rotativo a vácuo Fisatom (Modelo 802) com banho termostatizado técnico TE-184® até secura, sendo recuperado em 30 mL de água MiliQ em frasco de vidro de 35,00 mL com tampa de teflon e septo de silicone. Uma microseringa de 10 µL com agulha de aço (701 RN, Hamilton, USA) contendo 1,6 µL de n-hexano foi introduzido no frasco e a ponta da agulha foi mergulhada na amostra aquosa e o êmbolo foi empurrado lentamente expondo a microgota na solução a cerca de 4 centímetros de profundidade. A microgota de 1,6 µL foi mantida em contato com a amostra sob agitação magnética durante 30 minutos a 17 °C. Após a extração 1,0 µL foi injetado no CG/DCE. Antes de cada extração a microseringa foi lavada com solvente extrator para garantir limpeza completa e eliminação de bolhas de ar.

Os extratos foram analisados utilizando um cromatógrafo a gás (Shimadzu GC-17A) com detector por captura de elétrons (CG-DCE) localizado no laboratório de química analítica (LAQUA) pertencente à Universidade Federal de Viçosa, e as concentrações dos agrotóxicos foram determinadas.

### 3.4. Otimização da hifenação das técnicas extração sólido líquido com partição em baixa temperatura e microextração em gota única

A hifenação das técnicas foi realizada em duas etapas, sendo a primeira a otimização da SLE/LTP na qual foram avaliados os parâmetros mistura extratora, tipo de agitação e tempo de congelamento e a segunda a da SDME conforme descrito no item 3.3 do capítulo 1.

### 3.4.1. Avaliação da mistura extratora, tipo de agitação e tempo de congelamento na extração dos princípios ativos na etapa SLE/LTP

A técnica de extração SLE/LTP foi submetida à etapa de otimização para extração dos agrotóxicos do solo. Para avaliar o comportamento simultâneo dos fatores: (1) tipo de agitação (vórtex por 1 min ou mesa agitadora por 30 minutos), (2) quantidade de acetato de etila na mistura extratora (0,2 mL ou 1,5 mL) e (3) tempo de congelamento (3,5 horas ou 6 horas) foi realizado um planejamento fatorial  $2^3$ . Para cada um dos fatores foram estudados dois níveis, nível mínimo (-) e nível máximo (+).

Como o experimento envolve três fatores com dois níveis cada um, a execução do planejamento foi realizada em oito ensaios, com todas as possíveis combinações dos níveis (-) e (+). Cada ensaio foi realizado em duplicata, totalizando dezesseis experimentos (Tabela 2.1).

A escolha dos níveis foi baseada em trabalhos anteriores realizados no LAQUA (Laboratório de Química Analítica) da Universidade Federal de Viçosa. [40]

**Tabela 2.1-** Planejamento fatorial  $2^3$  para avaliação dos fatores na recuperação de agrotóxicos em solo usando a técnica SLE/LTP.

Experimentos	Fatores codificados			Fatores originais		
	F(1)	F(2)	F(3)	Tipo agitação (1)	Tempo congelamento (2) (h)	Volume de acetato (3) (mL)
1 e 9	-	-	-	vortex	3,5	0,2
2 e 10	+	-	-	mesa	3,5	0,2
3 e 11	-	+	-	vortex	6	0,2
4 e 12	+	+	-	mesa	6	0,2
5 e 13	-	-	+	vortex	3,5	1,5
6 e 14	+	-	+	mesa	3,5	1,5
7 e 15	-	+	+	vortex	6	1,5
8 e 16	+	+	+	mesa	6	1,5

### 3.4.2. Otimização da técnica SDME para análise de agrotóxicos em solo

Os fatores que foram avaliados para otimizar a técnica SDME em amostras de solo para determinar agrotóxicos, são velocidade de agitação (60, 100, 155 e 250 rpm), volume da microgota (1,4; 1,6; 2,0 e 2,4  $\mu\text{L}$ ), tempo de exposição da microgota (10, 20, 25, 30 e 35 min), solvente extrator (n-hexano e tolueno), força iônica (0,0 e 2,0  $\text{molL}^{-1}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), temperatura da amostra (17 e 25  $^{\circ}\text{C}$ ), sendo que os três últimos foram avaliados usando um planejamento fatorial  $2^3$  enquanto os

demais foram avaliados univariadamente. Os ensaios foram realizados em triplicata. Esse estudo foi realizado como descrito no capítulo 1.

### **3.5. Análise cromatográfica**

As análises qualitativas e quantitativas dos sete princípios ativos avaliados foram realizadas em cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-17A, com detector por captura de elétrons (DCE).

As condições cromatográficas otimizadas para as análises foram idênticas às descritas no capítulo 1 uma vez que os princípios ativos estudados foram alguns dos estudados para as amostras de água.

A identificação dos picos cromatográficos de cada composto foi realizada por comparação dos cromatogramas com os de padrões puros em solvente orgânico e a quantificação foi realizada através de curvas de superposição de matriz.

### **3.6. Validação do método analítico hifenado**

As figuras de mérito avaliadas neste estudo para validação do método SLE/LTP - SDME e análise por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG-DCE) foram seletividade, linearidade de resposta do método, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária) e fator de enriquecimento.

#### **3.6.1. Seletividade**

A seletividade do método analítico foi avaliada comparando-se cromatogramas de extratos da matriz isenta dos agrotóxicos, com cromatogramas de uma solução em acetonitrila contendo os princípios ativos de interesse. Foram preparados brancos das amostras de solo para confirmar a ausência dos agrotóxicos através da injeção no cromatógrafo a gás com detector por captura de elétrons e comparação dos tempos de retenção dos agrotóxicos.

Todos os extratos foram preparados e analisados de acordo com a metodologia otimizada.

Na seletividade do método de análise avaliaram-se as condições cromatográficas que permitiram a separação de todos os picos dos agrotóxicos.

### 3.6.2. Linearidade de resposta do método

A linearidade de resposta do método foi determinada pela injeção de extratos obtidos de amostras brancas fortificadas em 5 concentrações distintas em triplicata dos princípios ativos trifluralina (0,8 a 9,2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), alaclor (1,2 a 13,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), lindano (0,27 a 3,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), parationa metílica (0,6 a 6,50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), endrin (1,0 a 12,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), dieldrin (0,9 a 11,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), 4,4'- DDT (1,8 a 21,3  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) submetidas à técnica de extração otimizada.

Após a análise cromatográfica dos extratos foram construídas curvas analíticas, relacionando as áreas dos analitos com as concentrações mencionadas.

### 3.6.3. Limite de detecção e limite de quantificação do método

Para determinação dos limites de detecção e de quantificação foi construída uma curva analítica usando amostras fortificadas de solo isentas dos compostos de interesse na faixa próxima aos limites de detecção. O limite de detecção foi expresso como:

$$LD = 3,3\left(\frac{s}{S}\right)$$

onde  $s$  é a estimativa do desvio padrão da resposta e  $S$  é a inclinação da curva analítica. Analogamente o limite de quantificação foi expresso por:

$$LQ = 10\left(\frac{s}{S}\right)$$

### 3.6.4. Exatidão

Para a avaliação da exatidão do método de SLE/LTP-SDME proposto foram realizados ensaios de recuperação. Nestes os agrotóxicos foram adicionados às amostras de solo em concentrações iguais a uma, seis e doze vezes os seus limites de quantificação e o procedimento de extração otimizado foi aplicado.

### 3.6.5. Precisão

Por um estudo intralaboratorial avaliou-se a precisão do método, na qual foi estudada a repetitividade e a precisão intermediária. Os ensaios de precisão foram

realizados em sete repetições independentes em um nível de concentração. As concentrações escolhidas para o estudo foram iguais a seis vezes o limite de quantificação do método, concentração central em relação à faixa de trabalho estudada.

Na Tabela 2.2 estão as concentrações que foram usadas para os ensaios de precisão do método para cada um dos 7 agrotóxicos.

**Tabela 2.2-** Concentrações das amostras avaliadas nos ensaios de precisão (repetitividade e precisão intermediária) para cada agrotóxico

Composto	Concentração avaliada para os ensaios de precisão ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Trifluralina	4,6
Alaclor	6,7
Lindano	1,6
Parationa	1,1
Dieldrin	6,0
Endrin	5,3
4,4'- DDT	10,6

### 3.6.5.1. Repetitividade

A repetitividade, de acordo com o que é recomendado pelo INMETRO [20], foi avaliada pelo preparo, injeção e análise no mesmo dia de sete extratos de amostras de solo fortificadas com os sete agrotóxicos, e submetidas à técnica de extração otimizada, em concentrações iguais a seis vezes o limite de quantificação (Tabela 2.2) para cada agrotóxico. Para tal avaliação, determinou-se os coeficientes de variação (CV) referentes à da área do analito para cada agrotóxico.

### 3.6.5.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada por meio da porcentagem de recuperação dos agrotóxicos em estudo, e seus respectivos coeficientes de variação, obtidos da análise dos extratos de sete amostras de solo fortificadas com os agrotóxicos estudados, e submetidas pela técnica de extração otimizada, iguais aos valores mostrados na Tabela 2.2 para cada agrotóxico, em três dias diferentes (1º, 5º e 7º dia).

### 3.7. Determinação do fator de enriquecimento

Após a otimização da técnica de SLE/LTP-SDME e análise por CG-DCE, a mesma foi empregada na extração e análise de 3 amostras de solo contendo os agrotóxicos estudados. Essas amostras foram fortificadas de modo a obter extrato orgânico com os agrotóxicos em diferentes concentrações como mostrado na Tabela 2.3.

**Tabela 2.3-** Concentrações dos agrotóxicos nas amostras de solo avaliadas para determinação do fator de enriquecimento

Composto	Concentração avaliada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Trifluralina	4,6
Alaclor	11,3
Lindano	2,2
Parationa	3,2
Dieldrin	4,8
Endrin	5,3
4,4'- DDT	14,2

Para as quantificações foram construídas curvas analíticas para cada agrotóxico a partir da injeção direta de triplicatas de soluções-padrão dos compostos em solvente orgânico na faixa de concentração de 5 a 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ . O fator de enriquecimento foi obtido usando a seguinte equação:

$$FE = (C_{sol} * 1000) / C_{fort}$$

Onde: FE: Fator de enriquecimento

$C_{sol}$ : concentração obtida pela curva do solvente em  $\mu\text{g L}^{-1}$

$C_{fort}$ : concentração de fortificação da amostra em  $\text{ng L}^{-1}$

### 3.9. Amostras de solo fortificadas

O procedimento otimizado e validado foi aplicado para análise de agrotóxicos em 3 amostras de solo coletados na cidade de Manhuaçu, Minas Gerais. A Tabela 2.4 mostra a localização dos pontos de coleta e as principais propriedades físico-químicas de cada uma das amostras de solo analisadas. As amostras foram fortificadas em 3 níveis de concentração (LQ, 3 LQ e 5 LQ) para cada um dos compostos estudados e a porcentagem de recuperação relativa foi calculada.

**Tabela 2.4-** Localização dos pontos onde foi realizada a coleta das amostras e as principais propriedades físico-químicas dos solos

Ponto	Coordenadas UTM 23K SAD 69	Areia + Silte (g kg <sup>-1</sup> )	Argila (g kg <sup>-1</sup> )	Classe Textural	pH	MO (dag dm <sup>-3</sup> )
1	6797322/ 7746237	588	412	Argiloso	5,2	2
2	6796951 / 7739806	612	388	Argiloso	5,9	4
3	6805163 / 7738355	625	375	Argiloso	4,6	2

### 3.10. Análise Estatística

Os dados obtidos foram comparados através da ANOVA com *Post-Hoc* teste Tukey ao nível de 95% de confiança utilizando software Statistica® 8.

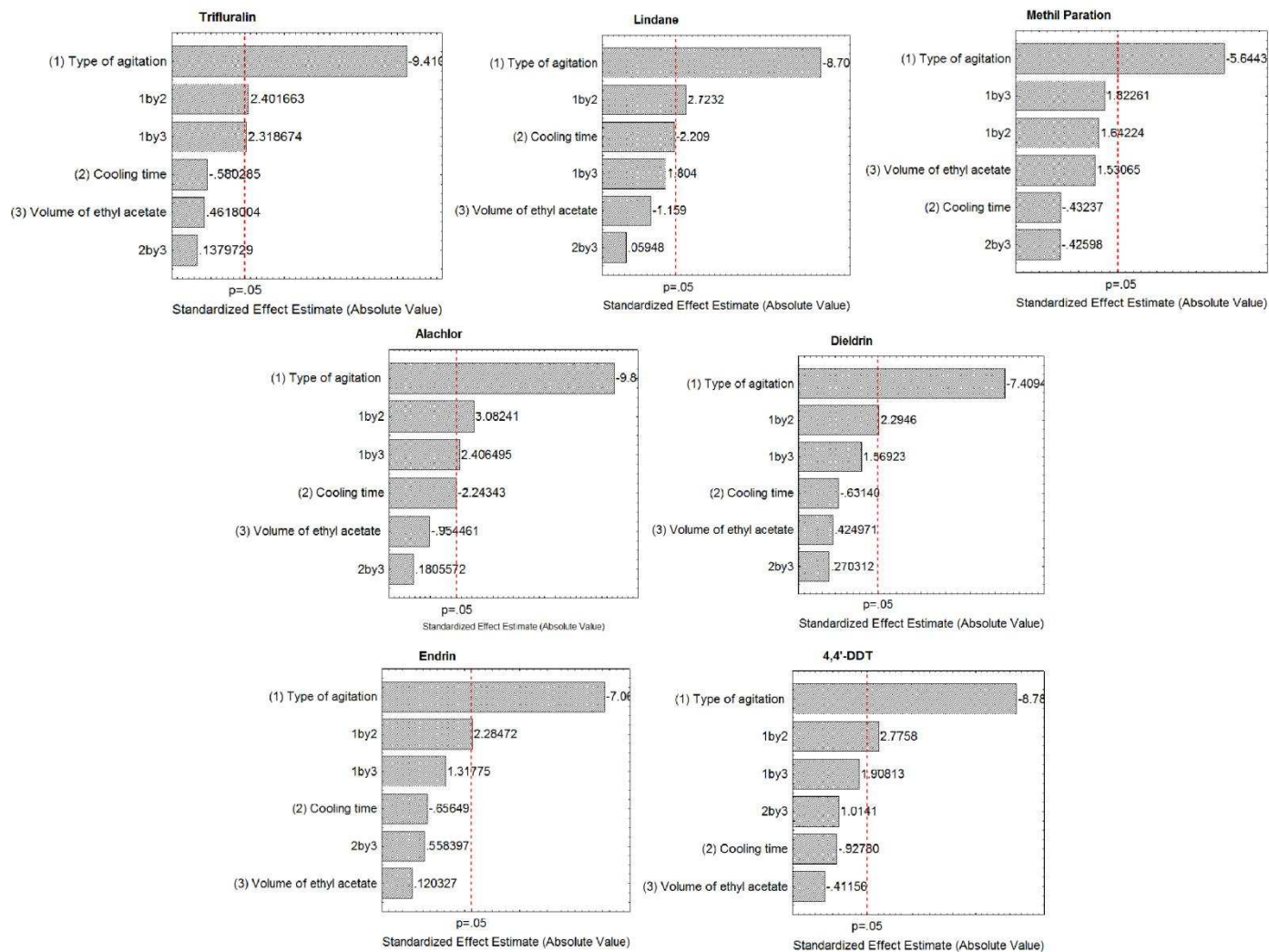
## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Otimização do método analítico**

#### **4.1.1. Avaliação da mistura extratora, tipo de agitação e tempo de congelamento na extração dos princípios ativos na SLE/LTP**

A otimização da SLE/LTP avaliando o tipo de agitação, o tempo de congelamento e o volume de acetato na mistura extratora, tendo como resposta a área cromatográfica, foi realizada de acordo com planejamento fatorial completo  $2^3$  em duplicata. Na Figura 2.1 é apresentado os gráficos de Pareto para os efeitos dos fatores sobre a extração dos analitos.

## Capítulo 2- Resultados e Discussão



**Figura 2.1-** Gráfico de Pareto para os efeitos tipo agitação, volume de acetato e tempo de refrigeração na otimização da SLE/LTP para determinação de agrotóxicos em solo.

Pela análise dos efeitos dos fatores sobre a determinação dos agrotóxicos no solo verificou-se que para todos os compostos estudados o tempo de congelamento, assim como o volume de acetato adicionado a mistura extratora não foram significativos ao nível de 95% de confiança ( $\alpha < 0,05$ ). O tipo de agitação foi significativo para todos os compostos estudados. Ou seja, o tempo que as amostras permanecem no freezer não interfere na quantidade de analito que é extraído do solo para a mistura extratora.

No que diz respeito à mistura extratora procurou-se avaliar duas possíveis misturas extratoras propostas por Vieira [27] que utiliza um volume de acetato de etila igual a 0,2 mL para análise de solo e outra que utiliza 1,5 mL de acetato de etila usado por Costa [34], Soares [36] e Costa [37] para diversas matrizes tais como abacaxi, uva, alface e água. Além disso, os estudos realizados por Vieira [40] mostram que o volume de 1,5 mL de acetato de etila é o volume máximo que pode ser usado no procedimento de extração SLE/LTP para que não ocorra a separação de fases antes da etapa de resfriamento. No entanto pela análise do gráfico de Pareto a quantidade de acetato de etila não influencia na porcentagem de extração dos compostos avaliados. Optou-se então por usar um volume menor de acetato de etila.

As interações de segunda ordem entre os fatores agitação e refrigeração foram significativas positivamente para a maioria os compostos, exceto para parationa metilica, endrin e dieldrin. Ou seja, a agitação em vórtex e tempo de congelamento por 3,5 h ou agitação com mesa agitadora por 30 min e tempo de congelamento de 6 h são condições melhores. Optou-se então, pela primeira combinação a fim de aumentar a frequência analítica do método.

Avaliou-se também dois tipos de agitação, mesa agitadora por 30 min proposto por Vieira [40] e outro tipo de agitação que seria vórtex por 1 min. Sendo que nesse caso o vórtex apresentou um melhor resultado para a quantidade de agrotóxicos extraído das amostras de solo, sendo que uma possível explicação seria a agitação mais efetiva provocado pela turbulência desse modo de agitação ocasionando assim um contato maior entre amostra e mistura extratora.

Então pelos valores críticos, as melhores condições experimentais foram: 0,2 mL de acetato na mistura extratora, 3,5 horas de congelamento e agitação em vórtex por 1 min no vórtex.

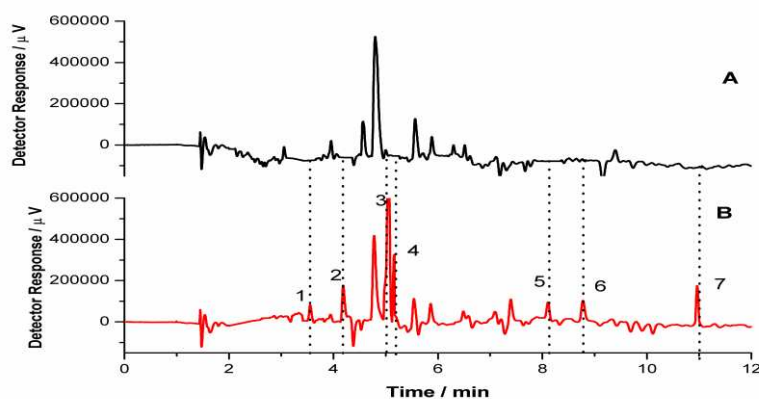
#### 4.1.2. Método otimizado

O método de extração consiste em colocar 4,0000 g de amostra de solo em contato com um volume de mistura extratora na proporção de aproximadamente 1:2 fase água/ fase orgânica constituída por 7,8 mL de acetonitrila, 0,2 mL de acetato de etila e 4,0 mL de água. A mistura foi homogeneizada em vórtex por 1 min e colocada no freezer a -20 °C por um tempo de 3,5 horas. Após a separação de fases pelo congelamento do solo e da fase aquosa, o sobrenadante contendo os solventes orgânicos e os analitos de interesse foi passado por um funil de vidro contendo papel de filtro. A fase orgânica foi então evaporada em evaporador rotativo a vácuo Fisatom (Modelo 802) com banho termostatizado technical TE-184® até secura, sendo recuperada em 30 mL de água Mili-Q em frasco de vidro de 35,00 mL com tampa de teflon e septo de silicone. Uma microseringa de 10 µL com agulha de aço (701 RN, Hamilton, USA) contendo n-hexano foi introduzido no frasco e a ponta da agulha foi mergulhada na amostra aquosa. O êmbolo foi empurrado lentamente expondo a microgota na solução a cerca de 4,0 centímetros da coluna de água. A microgota de 1,6 µL foi mantida em contato com a amostra sob agitação durante 30 minutos a 17 °C. Após a extração 1,0 µL foi injetado no CG/DCE. Antes de cada extração a microseringa foi lavada com solvente extrator para garantir limpeza completa e eliminação de bolhas de ar.

Os extratos foram analisados utilizando um cromatógrafo a gás (Shimadzu GC-17A) com detector por captura de elétrons (CG-DCE).

#### 4.2. Validação do método analítico hifenado

Para avaliar a seletividade injetou-se um extrato do branco da matriz isenta de agrotóxicos e de uma amostra de solo fortificada e comparou-se a não existência de picos no cromatogramas do branco da matriz no mesmo tempo de retenção dos compostos de interesse. Na Figura 2.2 é mostrada a sobreposição dos cromatogramas do branco (A) e uma amostra fortificada (B).



**Figura 2.2-** Cromatogramas do branco de amostra de solo (A) e amostra fortificada a  $30 \mu\text{g kg}^{-1}$  (B). Os picos mostrados 1. Trifluralina ( $t_R = 3,56$ ), 2. Alaclor ( $t_R = 3,56$ ), 3. Lindano ( $t_R = 5,06$ ), 4. parationa metílica ( $t_R = 5,17$ ), 5. Endrin ( $t_R = 8,14$ ), 6. Dieldrin ( $t_R = 8,82$ ) e 7. 4,4'- DDT ( $t_R = 11,02$ ).

Como é possível observar na Figura 2.2 o cromatograma do branco da matriz (A) não apresenta picos no tempo de retenção dos compostos estudados, portanto, o método é seletivo para tais princípios ativos.

Para avaliar a linearidade do método SLE/LTP-SDME testou-se o modelo linear simples e através do gráfico de resíduos a homocedasticidade dos dados. No entanto os dados mostraram-se heterocedásticos. Com isso aplicou-se e o modelo de regressão linear ponderada que é a forma mais simples de harmonizar as discrepâncias entre as variâncias dos pontos que a reta possui. Ou seja, diminui a influência das concentrações com maior dispersão dos dados.

O peso para cada ponto da curva foi calculado como sendo:

$$w = 1/s^2$$

Onde  $s^2$  é a estimativa do desvio padrão das respostas para cada concentração.

Na Tabela 2.5 é apresentada a faixa de trabalho, a equação obtida pelo método de regressão linear ponderada, assim como, o valor para o coeficiente de correlação (r) para cada um dos sete compostos.

**Tabela 2.5-** Valores para a faixa de trabalho, equações de regressão linear e os coeficientes de correlação para os sete agrotóxicos

Agrotóxico	Faixa de trabalho*	Equação	r
Trifluralina	0,8 a 9,2	$y = 492,3x + 68311,4$	0,994
Alaclor	1,2 a 13,5	$y = 597,3x - 6646,6$	0,993
Lindano	0,27 a 3,5	$y = 1486,4x - 34142,4$	0,994
Parationa Metílica	0,6 a 6,5	$y = 969,5x - 51488,8$	0,976
Dieldrin	0,9 a 10,6	$y = 313,9x + 7357,6$	0,999
Endrin	1,0 a 12,0	$y = 376,8x + 110504,3$	0,847
4,4'- DDT	1,8 a 21,3	$y = 280,8x - 51607$	0,990

\*faixa de trabalho em  $\mu\text{g kg}^{-1}$

O método de regressão linear ponderada para o composto endrin mostrou baixa adequação uma vez que o valor do coeficiente de correlação (r) foi menor que 0,91 de acordo com o IMETRO [20].

Usualmente para explicar a baixa adequação do modelo de um determinado analito pode-se considerar o fato deste apresentar comportamento ácido-base o que levaria a degradação por influência de variações de pH o que causaria variações no procedimento de extração alterando a resposta cromatográfica. Outra explicação seria a baixa resolução do pico ou instabilidade da linha de base do cromatograma devido ao detector ou a matriz o que também causaria oscilação na resposta do pico. No entanto o pico do endrin apresenta boa resolução e não se encontra em região onde existe grande quantidade de ruído na linha de base, assim como também não existem vales no cromatograma. Pela fórmula estrutural pode se concluir que ele não apresenta comportamento ácido base não se adequando portanto em nenhuma dessas justificativas.

Para os outros compostos pode-se concluir que a faixa de trabalho é linear.

Os valores de LD e o LQ do método proposto foram determinados usando os parâmetros da curva analítica calculados usando o software Microsoft Excel®. Os valores encontrados para os limites de detecção e quantificação para o método SLE/LTP-SDME para amostras de solo são mostrados na Tabela 2.6.

**Tabela 2.6-** Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método SLE/LTP/ SDME para os agrotóxicos estudados em amostra de solo

Agrotóxico	LD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Trifluralina	0,255	0,765
Alaclor	0,375	1,125
Lindano	0,090	0,270
Parationa Metílica	0,180	0,540
Dieldrin	0,295	0,885
Endrin	0,333	1,000
4,4'- DDT	0,590	1,770

Pelos valores mostrados na tabela conclui-se que o método proposto apresenta baixos limites de detecção e quantificação. Os valores encontrados nesse trabalho apresenta uma faixa menor para os limites de quantificação do que os valores relatados por Salemi e colaboradores (2013) cuja faixa varia de 0,7 a 6,6  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para análise de organofosforados em amostra de solo usando o método de *headspace*. [41]

Nos ensaios de recuperação os agrotóxicos foram adicionados em amostras de solo em concentrações iguais a uma, seis e doze vezes o limite de quantificação do método. Desta forma, os ensaios foram realizados em triplicatas independentes conforme o método otimizado sendo que as concentrações foram variáveis para cada agrotóxico nas amostras de solo.

Na Tabela 2.7 estão os resultados obtidos para recuperação relativa dos agrotóxicos em solo, bem como os coeficientes de variação (CV) referentes às porcentagens de recuperação relativa de cada um dos compostos nos 3 níveis de concentração.

**Tabela 2.7-** Porcentagens de recuperação relativa média e coeficientes de variação (CV) obtidos pela análise de extratos obtidos de amostra de solo fortificada com os agrotóxicos em três níveis de concentrações diferentes

Agrotóxico	Conc. da amostra ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Recuperação* (%)	CV(%)
Trifluralina	0,77	90,6	8,5
	4,59	95,3	7,1
	9,2	107,6	4,4
Lindano	0,27	98,6	2,2
	1,62	67,2	0,5
	3,24	69,4	3,4
Alaclor	1,125	83,8	9,5
	6,75	116,5	0,9
	13,5	102,9	1,8
Parationa Metílica	0,54	99,9	0,2
	1,08	90,6	8,7
	6,48	86,5	18,8
Dieldrin	1,0	99,5	3,8
	6,0	98,5	8,5
	10,0	99,9	0,3
Endrin	0,885	102,1	17,4
	5,31	122,5	1,2
	10,62	111,1	1,1
4,4'- DDT	1,77	91,8	1,9
	14,16	76,2	2,9
	21,24	99,9	4,2

\*recuperação relativa

De acordo com o Manual de Garantia da Qualidade Analítica (MAPA) [23] para níveis de concentrações baixas são aceitáveis porcentagens de recuperação na faixa de 50 e 120%. Como os níveis de concentração avaliados são baixos os resultados mostrados na Tabela 06 estão em conformidade com as exigências do MAPA [23] exceto para o endrin no nível de concentração igual a  $5,31 \mu\text{g kg}^{-1}$  que apresentou porcentagem de recuperação relativa de 122,5 %. Portanto o método pode ser considerado exato.

Os valores encontrados para os coeficientes de variação quando as amostras foram fortificadas na concentração igual a seis vezes o limite de quantificação são similares aos encontrados por Salemi e colaboradores (2013) na qual a faixa variou

de 2,1 a 6,5% quando as amostras foram fortificadas em um nível de concentração igual a cinco vezes o limite de quantificação do método descrito na literatura. [41]

A repetitividade é um dos parâmetros empregados para se avaliar a precisão, e definido como o grau de concordância entre os resultados, sob as mesmas condições de medição [20].

A repetitividade do método SLE/LTP- SDME dos sete agrotóxicos estudados em amostras de solo foi estudada pelo cálculo da estimativa do coeficiente de variação de sete repetições da metodologia otimizada, ou seja, pelo preparo, injeção e análise no mesmo dia de sete extratos (n=7) de amostras de solo fortificadas pelos princípios ativos, em concentrações iguais a seis vezes o limite de quantificação de cada agrotóxico. A Tabela 2.8 mostra os valores de área média assim como os coeficientes de variação para cada agrotóxico.

**Tabela 2.8-** Área dos analitos e coeficientes de variação (CV) obtidos para análise dos sete extratos obtidos de amostras de solo fortificadas com os agrotóxicos

Agrotóxico	Concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Área média do analito	Coeficiente de variação (%)
Trifluralina	4,6	223250,3	11,4
Alaclor	6,8	513869	13,0
Lindano	1,6	142680,2	18,8
Parationa Metílica	1,1	295122,7	16,7
Dieldrin	6,0	358991,5	17,2
Endrin	5,3	516615,3	17,5
4,4'- DDT	10,6	231104,2	13,2

Esses resultados indicam boa repetitividade, já que para todos os compostos no nível de concentração estudado são aceitos coeficientes de até 23% de acordo com o MAPA. [23]

A precisão intermediária do método foi verificada através das áreas dos analitos e seus respectivos coeficientes de variação, obtidos pelo preparo, injeção e análise dos extratos de amostras de solo fortificadas pelos agrotóxicos em concentrações iguais a seis vezes o limite de quantificação, e submetidas à técnica de extração otimizada em, em três dias diferentes (1º, 3º e 5º dia) e em sete repetições independentes (n=21). Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 2.9.

**Tabela 2.9-** Valores de áreas médias e coeficientes de variação (CV) obtidos pela análise de extratos obtidos de amostra de solo fortificada com os agrotóxicos, em três dias diferentes

Agrotóxico	Área média 1º dia	Área média 3º dia	Área média 5º dia	Média	CV (%)
Trifluralina	223250,3	239990,9	264293,9	242511,7	12,1
Alaclor	513869,0	569425,0	586788,3	556694,1	14,0
Lindano	142680,2	133869,5	175929,6	150826,4	20,0
Parationa Metílica	295122,7	335871,5	326517,5	319170,6	16,6
Dieldrin	358991,5	313174,6	417551,1	363239,1	19,6
Endrin	516615,3	463831,0	602639,8	527695,4	18,0
4,4'- DDT	151062,1	128327,8	173286,4	150892,1	22,4

De acordo com os dados apresentados na Tabela 2.9 os coeficientes de variação para as análises realizadas em três dias distintos foi menor que 23% para todos os compostos estudados conferindo assim boa precisão ao método.

Para a determinação do fator de enriquecimento construiu-se curvas no solvente para cada agrotóxico avaliado e calculou-se a concentração para cada amostra. Os fatores de enriquecimento obtidos para os compostos variaram entre 3 e 93, exceto para o dieldrin que na concentração estudada não apresentou fator de enriquecimento, conforme mostrado na Tabela 2.10. Os valores obtidos estão numa faixa maior que os relatados por Salemi e colaboradores (2013) para extração de organofosforados em solo que foi de 1,4 a 12,7  $\mu\text{g kg}^{-1}$  o que indica um fator de enriquecimento satisfatório para análise desses compostos. [41].

**Tabela 2.10-** Fator de enriquecimento para cada um dos princípios ativos avaliados

Composto	Fator de enriquecimento
Trifluralina	12
Alaclor	4
Lindano	66
Parationa	93
Dieldrin	1
Endrin	8
4,4'- DDT	3

### 4.3 Amostras fortificadas de solo

O procedimento foi aplicado para análise de 3 amostras de solo coletadas na região do município de Manhuaçu-MG. Os resultados mostraram que em nenhuma das 3 amostras foram encontradas contaminações pelos compostos estudados. Para

avaliar os efeitos da matriz na extração dos agrotóxicos, as amostras foram fortificadas em concentrações iguais a 1, 3 e 5 vezes o limite de quantificação de cada agrotóxico.

As porcentagens de extração para os analitos variaram entre 61,5- 123,5% conforme mostrado na Tabela 2.11 demonstrando que o método é adequado para determinação de agrotóxicos em amostras de solo. Essa determinação da recuperação foi realizada usando uma curva analítica com superposição de matriz a qual foi preparada obtendo extratos de brancos fortificados em diferentes concentrações.

**Tabela 2.11-** Porcentagem de recuperação para amostras fortificadas de solo

Composto	Fort.* ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Solo 1 (% rec. ** $\pm$ RSD***)	Solo 2 (% rec. $\pm$ RSD)	Solo 3 (% rec. $\pm$ RSD)
Trifluralina	0,8	87,8 $\pm$ 2,8	100,8 $\pm$ 6,0	76,4 $\pm$ 6,8
	2,4	92,0 $\pm$ 2,4	108,3 $\pm$ 9,2	99,1 $\pm$ 3,1
	4,0	111,5 $\pm$ 4,8	76,6 $\pm$ 6,1	109,2 $\pm$ 3,6
Alaclor	1,1	113,5 $\pm$ 7,9	81,4 $\pm$ 3,5	77,8 $\pm$ 5,4
	3,3	100,1 $\pm$ 9,0	94,0 $\pm$ 0,5	92,3 $\pm$ 8,5
	5,5	106,5 $\pm$ 1,7	96,0 $\pm$ 6,1	103,0 $\pm$ 2,3
Lindano	0,3	94,0 $\pm$ 3,1	100,8 $\pm$ 6,0	104,1 $\pm$ 14,3
	0,9	102,4 $\pm$ 0,3	92,3 $\pm$ 3,5	104,3 $\pm$ 2,4
	1,5	97,8 $\pm$ 6,4	61,0 $\pm$ 0,1	80,8 $\pm$ 4,3
Parationa Metílica	0,5	98,5 $\pm$ 3,8	106,6 $\pm$ 3,8	112,6 $\pm$ 4,0
	1,5	110,8 $\pm$ 7,1	86,3 $\pm$ 16,4	79,5 $\pm$ 1,9
	2,5	70,0 $\pm$ 0,7	73,9 $\pm$ 11,0	71,0 $\pm$ 2,0
Dieldrin	0,9	82,1 $\pm$ 3,2	92,4 $\pm$ 2,7	105,2 $\pm$ 4,7
	2,7	111,9 $\pm$ 9,9	114,3 $\pm$ 8,1	118,3 $\pm$ 2,3
	4,5	110,0 $\pm$ 1,2	109,4 $\pm$ 14,3	106,3 $\pm$ 2,1
Endrin	1,0	94,1 $\pm$ 10,1	101,3 $\pm$ 6,5	96,3 $\pm$ 10,0
	3,0	89,4 $\pm$ 6,2	82,5 $\pm$ 11,6	84,0 $\pm$ 6,4
	5,0	123,5 $\pm$ 1,6	111,3 $\pm$ 11,1	98,3 $\pm$ 12,0
4,4'- DDT	1,8	119,2 $\pm$ 0,6	109,8 $\pm$ 8,6	119,6 $\pm$ 2,7
	5,4	97,6 $\pm$ 0,7	97,6 $\pm$ 18,7	110,7 $\pm$ 13,6
	9,0	85,4 $\pm$ 7,4	81,3 $\pm$ 2,6	96,2 $\pm$ 9,6

\*Fortificação \*\* % rec. (porcentagem de recuperação relativa) \*\*\*RSD (desvio padrão relativo)

Avaliou-se através da ANOVA com teste *post-hoc* de Tukey ao nível de 95% de confiança se as porcentagens de recuperação relativas para os níveis de concentração estudados apresentavam diferença significativa entre si. Para a amostra de solo 1 apenas os compostos trifluralina, endrin e 4,4'- DDT apresentaram diferença nas recuperações. Para a amostra de solo 2 os compostos trifluralina e alaclor apresentaram tal diferença, enquanto que no solo 3 a trifluralina e a parationa metílica apresentaram tal diferença. Esse comportamento pode ser devido às características do solo, embora ainda se faça necessária uma caracterização dos mesmos para confirmar tal afirmativa.

## 5- CONCLUSÕES

A extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura hifenada com a microextração em gota única é uma nova técnica de extração que associada à cromatografia gasosa permitiu a determinação multirresíduos de agrotóxicos em solo.

A hifenação permitiu a unificação das vantagens das duas técnicas pela SLE/LTP obteve-se extratos relativamente puros, com remoção do material particulado e da turbidez da amostra, e a microextração em gota única permitiu que a análise fosse realizada em concentrações da ordem de  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

O método desenvolvido é simples, com pequeno número de etapas de manipulação da amostra, e de baixo custo quando comparado a métodos tradicionais, uma vez que faz uso de um pequeno volume de solvente orgânico e de equipamentos simples no processo de extração.

O método é seletivo, preciso, exato e com um elevado fator de enriquecimento, exceto para o dieldrin que este foi igual a 1. Além disso, foi possível aplicar a SDME em amostras sólidas, como por exemplo o solo.

Esse método se mostrou linear para os compostos avaliados exceto para o endrin o qual o modelo de regressão linear ponderado não se aplicou

O método foi aplicado em solos da região de Manhuaçu-MG e não foram encontradas contaminações por resíduos desses agrotóxicos em nenhuma das amostras analisadas. Essas amostras foram então fortificadas com baixos níveis de concentração e as porcentagens de recuperação estiveram na faixa de 61- 123,5% indicando que o método é adequado para análise de agrotóxicos em solo em baixos níveis de concentração.

## **Capítulo 3 – Hifenação das técnicas extração QuEChERS com a microextração em gota única para a determinação de resíduos de agrotóxico em solo**

### **1- INTRODUÇÃO**

O método de preparo de amostra ideal deve apresentar, seletividade, linearidade, baixos limites de detecção e quantificação, tudo isso, aliado a um pequeno número de etapas e um baixo custo.

Em 2003, Anastassiades e colaboradores, [42] introduziram um novo procedimento de preparo de amostras para extração de resíduos de pesticidas denominado QuEChERS (do inglês Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe Method). Esse método proposto tem algumas vantagens que segundo seu título seriam rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto. Durante o seu desenvolvimento, grande ênfase foi dada para a obtenção de um procedimento dinâmico, que pudesse ser aplicado em qualquer laboratório.

O método QuEChERS original envolve uma extração inicial de 10 g de amostra com 10 mL de acetonitrila, seguida por partição líquido-líquido formada pela adição de 4g  $MgSO_4$  anidro, que tem a função de remover o excesso de água da amostra; e mais 1 g de NaCl, para o ajuste da força iônica. A remoção da água residual e clean-up são realizadas ao mesmo tempo, usando um procedimento rápido chamado extração em fase sólida dispersivo, em que 150 mg  $MgSO_4$  anidro e 25 mg de sorvente amina primária secundária (PSA) são simplesmente misturadas com 1mL extrato de acetonitrila. A utilização de acetonitrila como solvente possibilita a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra, como por exemplo, ceras, gorduras e pigmentos.

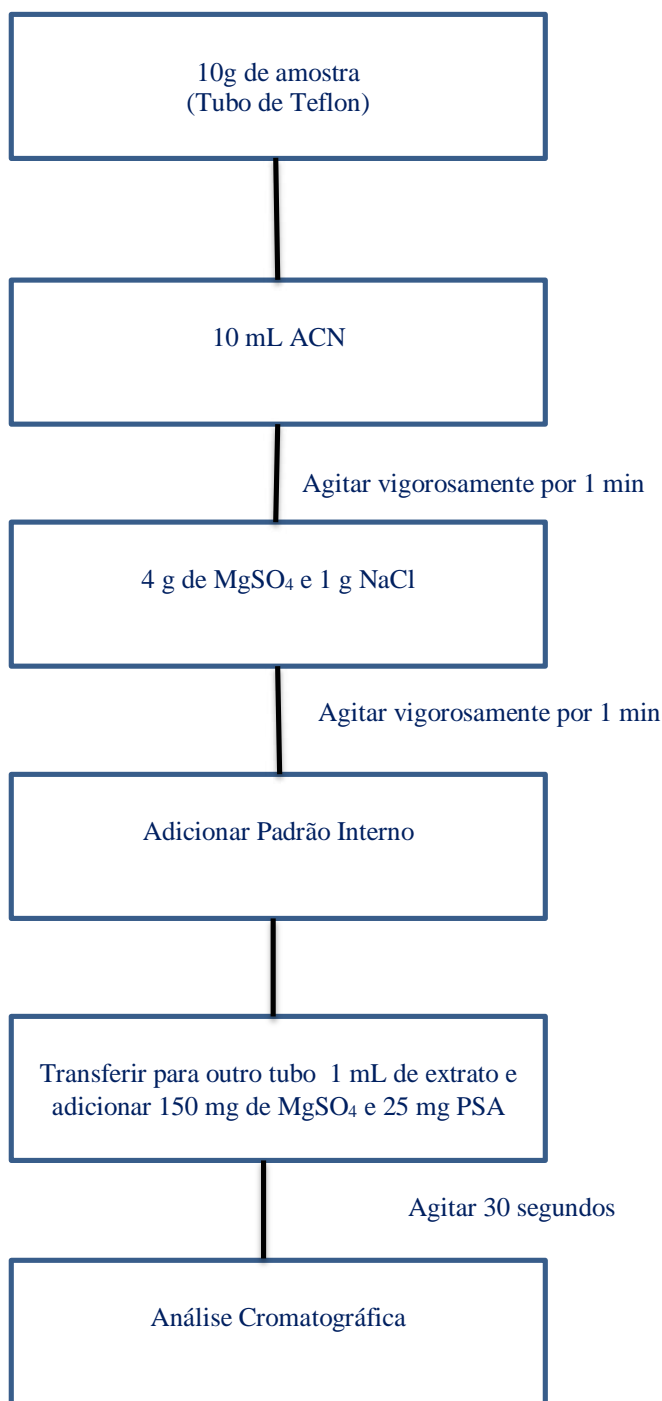
O PSA tem a função de remover açúcares, ácidos graxos, ácidos orgânicos e pigmentos. [42]

A etapa de limpeza é essencial para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico, uma vez que componentes não-voláteis da matriz podem ficar aderidos no sistema de injeção e também na coluna

cromatográfica, alterando a resposta do sistema.

Quando comparado com métodos comumente utilizados para análise de resíduos de pesticidas em alimentos, observa-se que a relação entre a quantidade de amostra: solvente obtida no método QuEChERS é baixa. Portanto, se a matriz não é uma fonte de ruídos na etapa de análise isto pode conduzir, no método QuEChERS, a valores de LQ mais elevados, para o mesmo volume de injeção que outros métodos.

O Fluxograma da Figura 3.1 representa de forma resumida o método QuEChERS original.



**Figura 3.1-** Fluxograma do método QuEChERS original.

O método QuEChERS foi modificado ao longo do tempo para as mais diversas matrizes, como por exemplo o proposto por Dong, 2009 e colaboradores para determinação de metaflumizona em solo no qual se faz uso 10,0 g de amostra e 10 mL de acetonitrila, etapas de agitação, adição de sais (NaCl e MgSO<sub>4</sub>), centrifugação e *clean up* (uso de PSA) para posterior análise por cromatografia gasosa [ 43 ].

Semelhante à extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura o método QuEChERS não apresenta elevado fator de enriquecimento. E este se faz

necessário, para atingir limites cada vez mais baixos. Neste contexto o uso de uma técnica de pré-concentração durante o método se torna necessário.

Baseado nisso, o objetivo deste trabalho é propor um novo método de extração que alie as vantagens do método QuEChERS e da microextração em gota única para a determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de solo.

## 2-OBJETIVOS

### Objetivos gerais

- Desenvolver um método que combine o QuEChERS e a técnica microextração em gota única (SDME) para a extração e análise dos princípios ativos trifluralina, lindano, dieldrin, endrin e 4,4'-DDT em solos por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons.

### Objetivos específicos

- Otimizar a associação da técnica de extração QuEChERS com o técnica SDME para a extração dos compostos estudados em solo.
- Validar o método proposto para os analitos, analisando as seguintes figuras de mérito: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão intermediária, exatidão e fator de enriquecimento.
- Aplicar o método hifenado em amostras de diferentes solos.
- Comparar os métodos QuEChERS-SDME e SLE/LTP-SDME para análise de agrotóxicos em solo.

## **3- MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Preparo de soluções-padrão**

Soluções-padrão estoque de cada agrotóxico, na concentração de 1000,0 mg L<sup>-1</sup>, foram preparadas pela solubilização de padrões de trifluralina (99,3% m/m), lindano (99,8% m/m), dieldrin (97,9% m/m), endrin (99,3% m/m), 4,4'- DDT (98,8 % m/m), (Sigma-Aldrich), em acetonitrila grau HPLC da Sigma. Preparou-se soluções de trabalho nas concentrações de 10,0 mg L<sup>-1</sup>, a partir da diluição das soluções-padrão estoque, em acetonitrila que foram preparadas e armazenados conforme descrito no capítulo 1.

### **3.2. Amostras de solo**

Para a realização da otimização e validação do método foram utilizadas amostras de argissolo Vermelho-Amarelo, coletadas no vale da agronomia na Universidade Federal de Viçosa em Viçosa-MG. As amostras de solo foram coletadas a uma profundidade de 0 – 20 cm. Após as coletas as amostras foram secas ao ar, destorroadas e peneiradas em malha de 2 mm.

### **3.3. Combinação das técnicas extração QuEChERS com a microextração em gota única**

#### **3.3.1. Preparo e fortificação das amostras solo**

Amostras de solo de massa igual a 10,0000 g foram transferidas para frascos de polipropileno de 50,0 mL de capacidade, e fortificadas com volumes variando de 5 a 35 µL da solução de trabalho (10 mg L<sup>-1</sup>) contendo os cinco agrotóxicos. As amostras fortificadas foram deixadas em repouso por aproximadamente 2 horas em recipiente aberto, para que houvesse maior interação dos agrotóxicos com a amostra e para a evaporação do solvente. Posteriormente, estas amostras foram submetidas aos procedimentos de extração dos cinco agrotóxicos avaliados.

### 3.3.2. Extração dos agrotóxicos em solo

O método de extração consistiu em colocar 10,0000 g de amostra de solo em contato com um volume de mistura extratora constituída por 5,0 mL de água e 10,0 mL de acetonitrila. A mistura foi homogeneizada por 30 min em mesa agitadora. Em seguida, após a adição de 4,0 g de  $MgSO_4$  e 1,0 g de NaCl, a mistura foi agitada por 2 min no vórtex e centrifugada a 2100 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, 1,0 mL do sobrenadante foi recolhido e diluído em 29 mL de água Milli-Q em frasco de vidro de 35,00 mL com tampa de teflon e septo de silicone. Uma microseringa de 10  $\mu$ L com agulha de aço (701 RN, Hamilton, USA) contendo n-hexano foi introduzida no frasco e a ponta da agulha foi mergulhada na amostra aquosa. O êmbolo foi empurrado lentamente expondo a microgota na solução a cerca de 4 centímetros de profundidade. Uma microgota de 1,6  $\mu$ L foi mantida em contato com a amostra sob agitação durante 30 minutos a 17 °C. Após a extração 1,0  $\mu$ L foi injetado no CG/DCE. Antes de cada extração a microseringa foi lavada com solvente extrator para garantir limpeza completa e eliminação de bolhas de ar.

Os extratos foram analisados utilizando um cromatógrafo a gás (Shimadzu GC-2014) com detector por captura de elétrons (CG-DCE) localizado no laboratório de química analítica (LAQUA) pertencente à Universidade Federal de Viçosa, e as concentrações dos agrotóxicos foram determinadas.

### 3.4. Otimização da hifenação das técnicas extração sólido líquido com partição em baixa temperatura e microextração em gota única

A otimização da hifenação das técnicas foi realizada em duas etapas, sendo a primeira a etapa do método de extração QuEChERS adaptada de Dong 2009 e colaboradores [43] no qual uma das etapas de adição de sal, agitação e centrifugação foi substituída pela recuperação em 29 mL de água milli-Q e a segunda a da SDME foi descrita no item 3.3 do capítulo 1.

### 3.5. Análise cromatográfica

As análises qualitativas e quantitativas dos cinco princípios ativos avaliados foram realizadas em cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-2014, com detector por captura de elétrons (DCE).

As condições cromatográficas otimizadas para as análises foram idênticas às descritas no capítulo 1 uma vez que os princípios ativos foram alguns dos estudados para as amostras de água.

### **3.6. Validação do método analítico**

As figuras de mérito avaliadas neste estudo para validação do método QuEChERS - SDME e análise por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG-DCE) foram seletividade, linearidade de resposta do método, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária) e fator de enriquecimento.

A identificação dos picos cromatográficos de cada composto foi realizada por comparação dos cromatogramas com os de padrões puros em solvente orgânico e a quantificação foi realizada através de curvas de superposição de matriz.

#### **3.6.1. Seletividade**

A seletividade do método analítico foi avaliada comparando-se cromatogramas de extratos da matriz isenta dos agrotóxicos, com cromatogramas de extrato de uma amostra fortificada com princípios ativos de interesse na concentração de  $30\mu\text{g L}^{-1}$ . Foram preparados brancos das amostras de solo para confirmar a ausência dos agrotóxicos através da injeção no cromatógrafo a gás com detector por captura de elétrons e comparação dos tempos de retenção dos agrotóxicos.

Todos os extratos foram preparados e analisados de acordo com a metodologia otimizada.

Avaliou-se também as condições cromatográficas que permitiram a separação de todos os picos dos agrotóxicos.

#### **3.6.2. Linearidade de resposta do método**

A linearidade de resposta do método foi determinada pela injeção de extratos obtidos de amostras fortificadas em 7 concentrações distintas em triplicata dos princípios ativos trifluralina, lindano, endrin, dieldrin, 4,4'- DDT variando de 5 a  $35\mu\text{g kg}^{-1}$  submetidas à técnica de extração otimizada.

Após a análise cromatográfica dos extratos foram construídas curvas analíticas, relacionando as áreas dos analitos com as concentrações mencionadas.

### 3.6.3. Limite de detecção e limite de quantificação do método

Para determinação dos limites de detecção e de quantificação foi construída uma curva analítica usando amostras fortificadas de solo isentas dos compostos de interesse na faixa próxima aos limites de detecção. O limite de detecção é expresso como:

$$LD = 3,3 \left[ \frac{s}{S} \right]$$

onde  $s$  é a estimativa do desvio padrão da resposta e  $S$  é a inclinação da curva analítica. Analogamente o limite de quantificação é expresso por:

$$LQ = 10 \left[ \frac{s}{S} \right]$$

### 3.6.4. Exatidão

Para a avaliação da exatidão do método de QuEChERS-SDME proposto foram realizados ensaios de recuperação. Nestes os agrotóxicos foram adicionados às amostras de solo em concentrações iguais a uma, seis e doze vezes os seus limites de quantificação e o procedimento de extração otimizado foi aplicado.

### 3.6.5. Precisão

Por um estudo intralaboratorial avaliou-se a precisão do método, na qual foi estudada a repetitividade e a precisão intermediária. Os ensaios de precisão podem ser realizados em sete repetições em um nível de concentração. As concentrações escolhidas para o estudo foram iguais a  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ , concentração central em relação à faixa de trabalho estudada.

#### 3.6.5.1. Repetitividade

A repetitividade, de acordo com o que é recomendado pelo INMETRO [20], foi avaliada pelo preparo, injeção e análise no mesmo dia de sete extratos de amostras de solo fortificadas com os cinco agrotóxicos, e submetidas à técnica de extração

otimizada, em concentrações iguais a  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$  para cada agrotóxico. Para tal avaliação, determinou-se os coeficientes de variação (CV) referentes à da área do analito para cada agrotóxico.

### 3.6.5.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada por meio da resposta cromatográfica dos agrotóxicos em estudo, e seus respectivos coeficientes de variação, obtidos da análise dos extratos de sete amostras de solo fortificadas com os agrotóxicos estudados, e submetidas pela técnica de extração otimizada, iguais a  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$  para cada agrotóxico, em três dias diferentes (1<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dia).

### 3.7. Determinação do fator de enriquecimento

Após a otimização da técnica de SLE/LTP-SDME e análise por CG-DCE, a mesma foi empregada na extração e análise de 3 amostras de solo contendo os agrotóxicos estudados. Essas amostras foram fortificadas de modo a obter extrato orgânico com os agrotóxicos que quando diluído em 30,0 mL de água milli-Q na concentração de  $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Para as quantificações foram construídas curvas analíticas para cada agrotóxico a partir da injeção direta de triplicatas de soluções-padrão dos compostos em solvente orgânico na faixa de concentração de 10 a  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ .

### 3.9. Amostras de solo fortificadas

O procedimento otimizado e validado foi aplicado para análise de agrotóxicos em 3 amostras de solo coletados na cidade de Manhuaçu, Minas Gerais. A Tabela 3.1 mostra a localização dos pontos de coleta. As amostras foram fortificadas em 2 níveis de concentração ( $10$  e  $35 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) para cada um dos compostos estudados e a porcentagem de recuperação relativa foi calculada.

**Tabela 3.1-** Localização dos pontos onde foi realizada a coleta das amostras e as principais propriedades físico-químicas dos solos

Ponto	Coordenadas UTM 23K SAD 69	Areia + Silte ( $\text{g kg}^{-1}$ )	Argila ( $\text{g kg}^{-1}$ )	Classe Textural	pH	MO (dag $\text{dm}^{-3}$ )
1	6797322/ 7746237	588	412	Argiloso	5,2	2
2	6796951 / 7739806	612	388	Argiloso	5,9	4
3	6805163 / 7738355	625	375	Argiloso	4,6	2

### **3.10. Análise Estatística**

Os dados obtidos foram comparados através da ANOVA com Post-Hoc teste Tukey ao nível de 95% de confiança utilizando software Statistica® 8.

### **3.11. Comparação das técnicas QuEChERS- SDME e SLE/LTP- SDME**

As técnicas foram comparadas através das figuras de mérito da validação: repetitividade, precisão intermediária, limites de detecção e quantificação e recuperação. Foram também avaliados para fins comparativos os fatores de enriquecimento dos dois métodos propostos.

Além disso foi comparada a execução pelo analista de ambas hifenções, sendo que o mesmo analista executou os dois métodos e descreveu em termos de frequência analítica e dificuldades de execução dos mesmos.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Otimização do método analítico

#### 4.1.1. Otimização da hifenação das técnicas extração sólido líquido com partição em baixa temperatura e microextração em gota única

O novo método proposto que trata da hifenação das técnicas de extração QuEChERS e SDME consiste na adaptação e junção dos métodos propostos por Dong e colaboradores 2009 que utiliza QuEChERS para a determinação de metaflumizona em solo [43] e do proposto no capítulo 1 para determinação de resíduos de agrotóxicos em água usando SDME.

O método proposto por Dong 2009 consiste em adicionar 5,0 mL de água e 10,0 mL de acetonitrila em 10,0 g de solo e agitar vigorosamente por 30 min. Em seguida adicionar 1,0 g de NaCl e 4,0 g de MgSO<sub>4</sub> e agitar por 2 minutos em vórtex, centrifugar por 5 min a 2100 rpm. Após a centrifugação 1,0 mL do extrato orgânico é recolhido e a este é adicionado 30 mg de PSA (amina primária-secundária) e 200 mg de MgSO<sub>4</sub> e então a mistura é agitada por 1 min no vórtex e levada a centrífuga por 5 minutos a 2100 rpm. [43]

No desenvolvimento do método as etapas de adição de PSA, MgSO<sub>4</sub>, agitação em vórtex por 1 minuto e centrifugação foram substituídas pela diluição de 1,0 mL do extrato recuperado em 29 mL de água Milli-Q, aplicando-se posteriormente a técnica SDME conforme descrita no capítulo 1.

A fim de verificar se a eficiência da extração, amostras de solo foram fortificadas na concentração de 50 µg kg<sup>-1</sup> e submetidas ao método proposto e analisando-se os extratos por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons obteve-se resposta cromatográfica satisfatória indicando que o método extraía os compostos.

#### 4.1.2. Método otimizado

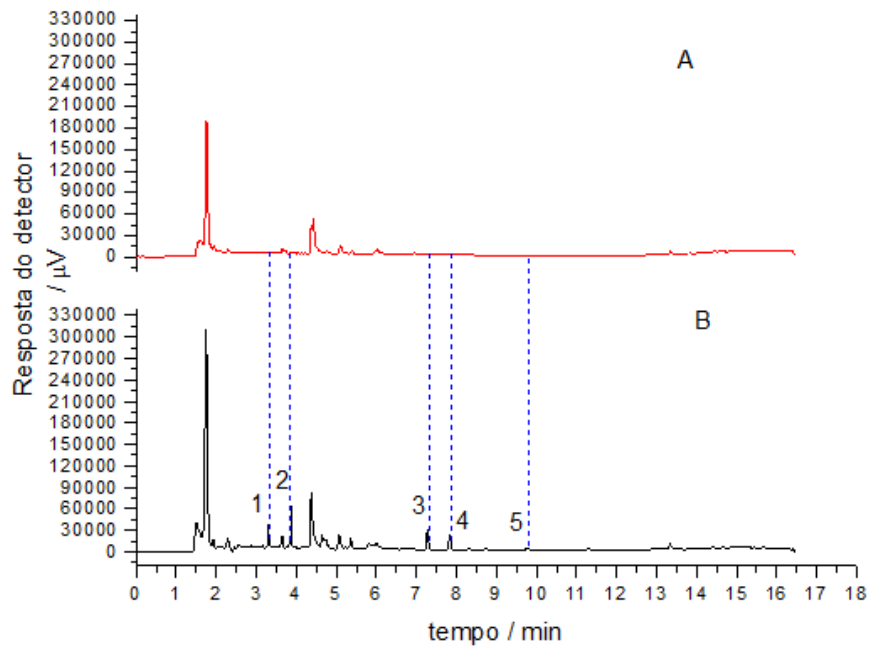
O método de extração consistiu em colocar 10,0000 g de amostra de solo em contato com um volume de mistura extratora na proporção de aproximadamente 1:2 fase aquosa/fase orgânica constituída por 5,0 mL de água e

10,0 mL de acetonitrila. A mistura foi homogeneizada em mesa agitadora por 30 min adicionando-se posteriormente 1,0 g de NaCl e 4,0 g de MgSO<sub>4</sub>. A mistura foi homogeneizada em vórtex por 2 min e posteriormente centrifugada a 2100 rpm por 5 min. Após essa etapa, 1,0 mL do sobrenadante foi recuperado em 29 mL de água Milli-Q em frasco de vidro de 35,00 mL com tampa de teflon e septo de silicone. Uma microseringa de 10 µL com agulha de aço (701 RN, Hamilton, USA) contendo n-hexano foi introduzida no frasco e a ponta da agulha foi mergulhada na amostra aquosa. O êmbolo foi empurrado lentamente expondo a microgota na solução a cerca de 4,0 centímetros da coluna de água. Uma microgota de 1,6 µL foi mantida em contato com a amostra sob agitação durante 30 minutos a 17 °C. Após a extração 1,0 µL foi injetado no CG/DCE. Antes de cada extração a microseringa foi lavada com solvente extrator para garantir limpeza completa e eliminação de bolhas de ar.

Os extratos foram analisados utilizando um cromatógrafo a gás (Shimadzu GC-2014) com detector por captura de elétrons (CG-DCE).

#### **4.2. Validação do método analítico**

Para avaliar a seletividade injetou-se um extrato do branco da matriz isenta de agrotóxicos e o extrato de uma amostra fortificada e comparou-se a não existência de picos no cromatogramas do branco da matriz no mesmo tempo de retenção dos compostos de interesse. A Figura 3.2 mostra a sobreposição dos cromatogramas do branco (A) e uma amostra fortificada (B).



**Figura 3.2-** Cromatogramas do branco de amostra de solo (A) e amostra fortificada a  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  (B). Os picos mostrados 1. Trifluralina ( $t_R = 3,56$ ), 2. Alaclor ( $t_R = 3,56$ ), 3. Endrin ( $t_R = 7,14$ ), 4. Dieldrin ( $t_R = 7,82$ ) e 5. 4,4'- DDT ( $t_R = 10,02$ ).

Como é possível observar na Figura 02 o cromatograma do branco da matriz (A) não apresenta picos no tempo de retenção dos compostos estudados, portanto, o método é seletivo para tais princípios ativos.

A linearidade de resposta do método foi determinada pela injeção e análise de extratos obtidos de amostras fortificadas em cinco concentrações diferentes em triplicata dos princípios ativos submetidas ao método otimizado e validado.

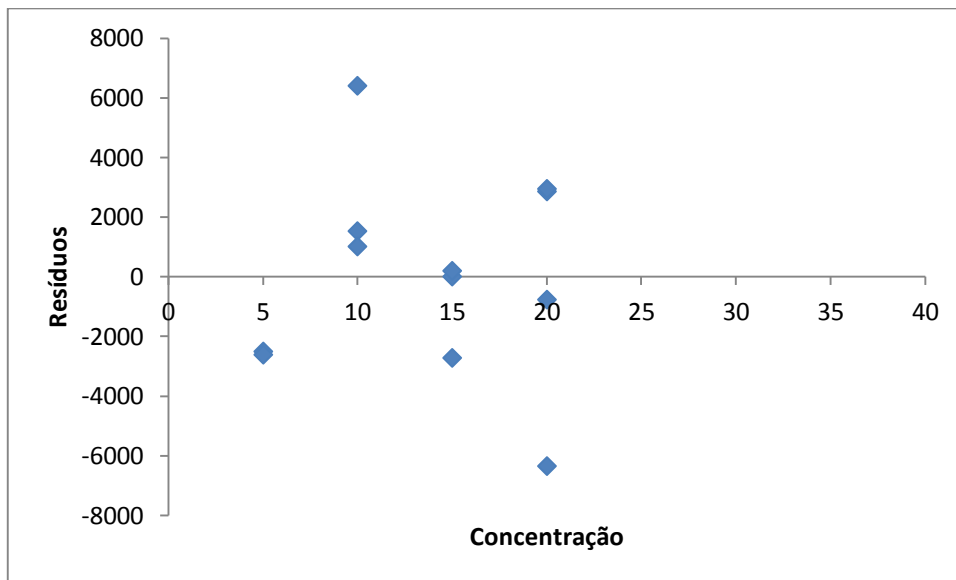
Após análise cromatográfica destes extratos foram construídas curvas analíticas, relacionando as áreas picos dos analitos com as concentrações, obtendo-se assim as equações de reta e os coeficientes de correlação. A Tabela 3.2 apresenta a equação obtida pelo método de regressão linear, assim como, o valor para o coeficiente de correlação ( $r$ ) para cada um dos cinco compostos. A faixa de trabalho para os compostos foi de 5 a  $35 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

**Tabela 3.2-** Valores para a faixa de trabalho, equações de regressão linear e os coeficientes de correlação para determinação dos agrotóxicos em solo usando o método hifenado QuEChERS-SDME

Agrotóxico	Equação	$r$
Trifluralina	$y = 4247,2x - 16916$	0,996
Alaclor	$y = 9532,7x - 31460$	0,996
Endrin	$y = 4371,8x - 12954$	0,991
Dieldrin	$y = 4581,4x - 9418,8$	0,993
4,4'- DDT	$y = 986,8x - 4380$	0,991

O método de regressão linear para todos compostos mostrou boa adequação uma vez que os valores dos coeficientes de correlação ( $r$ ) foram maiores que 0,99 satisfazendo as recomendações do IMETRO [20] e da Anvisa, [19], além disso foi feita a análise do gráfico de resíduos a fim de comprovar a homocedasticidade dos dados.

A Figura 3.3 mostra o gráfico de resíduos para o ajuste linear para o agrotóxico trifluralina, sendo que para os demais compostos estudados observou-se comportamento semelhante. O gráfico de resíduos apresentou distribuição uniforme caracterizando um comportamento homocedástico e portanto, as incertezas obtidas no modelo de regressão são confiáveis. Esse padrão também indica um bom ajuste do modelo aos dados experimentais concluindo-se então, que a faixa de trabalho é linear para todos os compostos.



**Figura 3.3** - Gráfico de resíduos para o ajuste linear para as respostas cromatográficas do princípio ativo trifluralina

Os valores de LD e o LQ do método proposto foram determinados usando os parâmetros da curva analítica calculados usando o software Microsoft Excel®. Os valores encontrados para os limites de detecção e quantificação para o método QuEChERS-SDME para amostras de solo foram mostrados pela Tabela 3.3.

**Tabela 3.3-** Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método QuEChERS- SDME para os agrotóxicos estudados em amostra de solo

Agrotóxico	LD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Trifluralina	0,54	1,65
Alaclor	0,64	1,94
Endrin	0,54	1,80
Dieldrin	0,41	1,38
4,4'- DDT	0,99	3,30

Pelos valores mostrados na tabela conclui-se que o método proposto apresenta baixos limites de detecção e quantificação. Os valores encontrados nesse trabalho apresentam uma faixa menor para os limites de quantificação do que os valores relatados por Rouvière e colaboradores (2012) [44] para análise de organoclorados aromáticos em amostra de solo cuja faixa variou de 2 a 2117  $\mu\text{g kg}^{-1}$  assim como por Dankyi e colaboradores (2014) [45] para a determinação de neonicotinóides em solo cuja faixa variou de 2 a 9  $\mu\text{g kg}^{-1}$  usando QuEChERS modificado.

Nos ensaios de recuperação os agrotóxicos foram adicionados em amostras de solo em concentrações iguais a 10, 20 e 35  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Os ensaios foram realizados em triplicatas independentes conforme o método otimizado nas amostras de solo.

Na Tabela 3.4 estão os resultados obtidos para recuperação relativa dos agrotóxicos em solo, bem como os coeficientes de variação (CV) referentes às porcentagens de recuperação relativa de cada um dos compostos nos 3 níveis de concentração.

Tabela 3.4- Porcentagens de recuperação relativa média e coeficientes de variação (CV) obtidos na determinação dos agrotóxicos em em três níveis de concentrações diferentes pelo método hifenado QuEChERS-SDME

Agrotóxico	Conc. da amostra ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Recuperação* (%)	CV(%)
Trifluralina	10	106,5	6,6
	20	102,4	2,4
	35	90,0	1,9
Alaclor	10	109,6	7,9
	20	104,8	8,7
	35	101,0	2,4
Endrin	10	82,3	6,5
	20	86,7	2,7
	35	78,8	2,0
Dieldrin	10	111,7	10,5
	20	108,3	9,5
	35	100,7	9,4
4,4'- DDT	10	107,1	13
	20	108,3	6,8
	35	104,4	4,3

\*recuperação relativa

De acordo com o Manual de Garantia da Qualidade Analítica (MAPA) [23] para níveis de concentrações baixas são aceitáveis porcentagens de recuperação na faixa de 80 e 120%. Como os níveis de concentração avaliados são baixos os resultados mostrados na Tabela 3.4 estão em conformidade com as exigências do MAPA [23] sendo o método considerado exato.

A repetitividade é um dos parâmetros empregados para se avaliar a precisão, e definido como o grau de concordância entre os resultados, sob as mesmas condições de medição. [20]

A repetitividade do método QuEChERS-SDME para os cinco agrotóxicos estudados em amostras de solo foi estudada pelo cálculo da estimativa do coeficiente de variação de sete repetições independentes da método otimizado ( $n=7$ ), ou seja, pelo preparo, injeção e análise no mesmo dia de sete extratos de amostras de solo fortificadas pelos princípios ativos, em concentrações iguais a  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$  para cada agrotóxico. A Tabela 3.5 mostra os valores de área média assim como os coeficientes de variação para cada agrotóxico.

**Tabela 3.5-** Área dos analitos e coeficientes de variação (CV) obtidos para análise dos sete extratos obtidos de amostras de solo fortificadas com os agrotóxicos

Agrotóxico	Área do analito	Coeficiente de variação (%)
Trifluralina	67380,5	9,5
Alaclor	169507,5	18,9
Endrin	89009,6	17,6
Dieldrin	87823,9	17,1
4,4'- DDT	15264,2	17,1

Esses resultados indicam boa repetitividade, já que para todos os compostos no nível de concentração estudado são aceitos coeficientes de até 20% de acordo com o MAPA [23].

A precisão intermediária é o outro parâmetro utilizado para se determinar a precisão de um método e se refere à precisão avaliada sobre a mesma amostra, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo a(s) condição(ões) a variar, tais como: diferentes analistas, equipamentos ou tempos [20].

A precisão intermediária do método foi verificada através das áreas dos analitos e seus respectivos coeficientes de variação, obtidos pelo preparo, injeção e análise dos extratos de amostras de solo fortificadas pelos agrotóxicos em concentrações iguais a 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , e submetidas à técnica de extração otimizada em, em três dias diferentes (1º, 3º e 5º dia) e em sete repetições independentes (n=21). Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 3.6.

**Tabela 3.6-** Valores de áreas médias e coeficientes de variação (CV) obtidos pela análise de extratos obtidos de amostra de solo fortificada com os agrotóxicos, em três dias diferentes

Agrotóxico	Área 1º dia	Área 3º dia	Área 5º dia	Média	CV (%)
Trifluralina	67380,5	58137,5	63739,8	63085,9	7,4
Alaclor	169507,5	118143,5	140888,0	142846,3	18,0
Endrin	89009,6	71550,7	88064,0	82874,8	11,8
Dieldrin	70042,0	52.434,1	63040,0	61838,7	14,3
4,4'- DDT	10958,9	8601,4	10101,3	9887,2	12,1

De acordo com os dados apresentados na Tabela 3.6 os coeficientes de variação para as análises realizadas em três dias distintos foram menores que 20% para todos os compostos estudados conferindo assim boa precisão ao método.

Para a determinação do fator de enriquecimento construiu-se curvas no solvente para cada agrotóxico avaliado e calculou-se a concentração para cada amostra. A concentração após a diluição de 1,0 mL do extrato orgânico em 29,0 mL

de água Mili-Q era de  $0,67 \mu\text{g L}^{-1}$ . Os fatores de enriquecimento obtidos para os compostos variaram entre 13,6 e 49, conforme mostrado na Tabela 3.7. Os valores obtidos estão, assim como da hifenação SLE/LTP-SDME, numa faixa maior que os relatados por Salemi e colaboradores (2013) para extração de organofosforados em solo que foi de 1,4 a 12,7 [41].

**Tabela 3.7-** Fator de enriquecimento para cada um dos princípios ativos avaliados

Composto	Fator de enriquecimento
Trifluralina	21,5
Alaclor	49,0
Dieldrin	30,4
Endrin	21,3
4,4'- DDT	13,6

### 4.3 Amostras fortificadas de solo

O procedimento foi aplicado para análise de 3 amostras de solo coletadas na região do município de Manhuaçu-MG. Os resultados mostraram que em nenhuma das 3 amostras foi encontrada contaminação pelos compostos estudados. Para avaliar os efeitos da matriz na extração dos agrotóxicos, as amostras foram fortificadas em concentrações iguais a 10 e  $35 \mu\text{g kg}^{-1}$  para cada agrotóxico.

As porcentagens de extração para os analitos variaram entre 26-153,% conforme mostrado na Tabela 3.8 demonstrando que o método é adequado para determinação de agrotóxicos em amostras de solo já que para a maioria dos compostos nos diferentes solos ficou dentro de 70 a 120%. Os valores que estão fora dessa faixa indicam que esses compostos sofrem efeito de matriz. Essa determinação da recuperação foi realizada usando uma curva analítica com superposição de matriz.

**Tabela 3.8-** Porcentagem de recuperação para amostras fortificadas de solo

Composto	Fort.* ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Solo 1 (% rec.**.±RSD***)	Solo 2 (% rec.±RSD)	Solo 3 (% rec.±RSD)
Trifluralina	10	143,2 ±0,4	153,8±0,1	131,7±0,8
	35	92,1 ± 2,5	71,6±2,3	62,6±3,6
Alaclor	10	133,4±0,3	135,5±0,1	139,5±0,8
	35	104,6±2,3	63,9±3,9	70,0±0,2
Endrin	10	133,0±0,3	97,7±0,03	134,8±0,4
	35	119,6±4,1	80,7±0,07	70,6±1,5
Dieldrin	10	113,0±1,4	131,8±0,5	120,5±0,1
	35	93,0±0,8	57,9±2,8	54,6±3,8
4,4'- DDT	10	77,4±0,5	91,3±0,8	92,6±0,6
	35	54,2±3,1	40,1±3,15	26,6±3,3

\*Fortificação \*\* % rec. (porcentagem de recuperação relativa) \*\*\*RSD (desvio padrão relativo)

Pelos valores apresentados na Tabela 3.8 observou-se que para a maioria dos compostos o efeito de matriz é apresentado quando o agrotóxico se encontra em uma concentração mais baixa. Esses resultados estão em conformidade com os apresentados por Sousa e colaboradores, 2012 que avalia o efeito de matriz de diversos agrotóxicos em diversas matrizes incluindo solo [46].

#### 4.4. Comparação das técnicas QuEChERS- SDME e SLE/LTP- SDME

A Tabela 3.9 apresenta uma comparação entre as principais figuras de mérito da validação das técnicas QuEChERS- SDME e SLE/LTP- SDME.

**Tabela 3.9-** Comparação entre as principais figuras de mérito da validação das técnicas QuEChERS- SDME e SLE/LTP-SDME

Agrotóxico	Faixa de trabalho ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		LD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		LQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		Repetitividade (CV)		Prec. Interm.* (CV %)		Rec**	FE***		
	SLE/LTP- SDME	QuEChER S- SDME	SLE/LTP- SDME	QuEChERS- SDME	SLE/LTP -SDME	QuEChERS- SDME	SLE/LTP- SDME	QuEChERS- SDME	SLE/LTP- SDME	QuEChERS- SDME		SLE/LTP- SDME	QuEChERS- SDME	
Trifluralina	0,8-9,2	5-35	0,255	0,54	0,8	1,65	11,4	9,5	12,1	7,4	90,6	106,5	12	21,5
Alaclor	1,2-13,5	5-35	0,375	0,64	1,2	1,94	13,0	18,9	14,0	18,0	98,6	109,6	66	49,0
Dieldrin	1,0-12,0	5-35	0,333	0,54	1,0	1,80	17,2	17,6	19,6	11,8	99,5	82,3	1	30,4
Endrin	0,9-10,6	5-35	0,295	0,41	0,9	1,38	17,5	17,1	18,0	14,3	102,1	111,7	8	21,3
4.4'-DDT	1,8-21,3	5-35	0,590	0,99	1,8	3,30	13,2	17,1	22,4	12,1	91,8	107,1	3	13,6
Lindano	0,27-3,5	-	0,090	-	0,27	-	18,8	-	20,0	-	83,8	-	4	-
Parationa Metílica	0,6-6,5	-	0,180	-	0,6	-	16,7	-	16,6	-	99,9	-	99	-

\*Precisão intermediária

\*\*Recuperação relativa média

\*\*\*Fator de enriquecimento

Na hifenação das técnicas QuEChERS-SDME somente um décimo do extrato orgânico é recolhido e diluído para 30,0 mL com água milliQ para aplicação da micrextração em gota única. Enquanto na hifenação SLE/LTP-SDME todo o extrato orgânico é evaporado e os analitos recuperados em 30,0 mL de água para a SDME. Mesmo sendo a massa da mostra da hifenação QuEChERS-SDME 2,5 vezes maior que a massa da amostra da hifenação SLE/LTP-SDME a diluição é de aproximadamente 1:30 ao passo que na SLE/LTP-SDME essa diluição seria de 4:30. Pelos valores apresentados na Tabela 3.9 pode se observar que os fatores de enriquecimento para a hifenação QuEChERS-SDME são maiores que os obtidos pela hifenação SLE/LTP-SDME, exceto para o Alaclor.

Os limites de detecção e quantificação da hifenação QuEChERS-SDME apresentam valores maiores que os da hifenação SLE/LTP-SDME para todos os agrotóxicos

Os valores encontrados para o coeficiente de variação ao se avaliar a repetitividade dos métodos são próximos, o que nos leva a concluir que ambos apresentam repetitividade similares. o mesmo ocorre para os coeficientes de variação em dias diferentes, exceto para o composto 4,4'-DDT que apresentou menor coeficiente de variação inter-dia para o método hifenado QuEChERS-SDME.

As porcentagens de extração relativas encontradas para os dois métodos hifenados são similares e estão dentro das exigências dos órgãos normativos para as faixas de concentração avaliadas.

Outro ponto importante a ressaltar é que para os compostos lindano e parationa metílica na hifenação QuEChERS-SDME apresentou elevada dispersão dos pontos, não apresentando assim boa linearidade, enquanto para SLE/LTP – SDME pode-se observar uma relação linear na faixa de trabalho estudada.

Quanto a prática laboratorial, ou seja, execução do método pelo analista a hifenação QuEChERS-SDME apresenta um número maior de etapas, tais como pesagem dos sais, centrifugações, agitação e transferências de volumes o que torna o processo mais demorado e laborioso do que a hifenação SLE/LTP-SDME que apresenta apenas uma etapa de agitação, congelamento e evaporação.

No entanto, em termos das figuras de mérito da validação, pode-se concluir que eles são equivalentes podendo ser aplicados para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de solo.

## 5- CONCLUSÕES

A técnica de extração QuEChERS combinada com a microextração em gota única é uma nova técnica de extração que associada à cromatografia gasosa permitiu a determinação multirresíduos de agrotóxicos em solo.

O acoplamento permitiu a unificação das vantagens das duas técnicas sendo que o QuEChERS realizou o *clean up* da amostra e a microextração em gota única permite que a análise seja realizada em concentrações da ordem de  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Considerando o baixo custo, esse método se mostrou linear, seletivo, preciso, exato e com um elevado fator de enriquecimento. Além disso, foi possível aplicar a SDME em amostras sólidas, como por exemplo o solo.

Para amostras de solos fortificadas as porcentagens de recuperação estiveram na faixa de 26- 153,0 % indicando que o método é adequado para análise de agrotóxicos em solo em baixos níveis de concentração e que para alguns compostos principalmente em baixas concentrações existe efeito de matriz.

Comparando-se as hifenações SLE/LTP- SDME e QuEChERS- SDME observou-se que a SLE/LTP- SDME apresenta menores limites de detecção e quantificação do que a QuEChERS- SDME, embora a QuEChERS- SDME apresente maiores fatores de enriquecimento para a maioria dos composto. AS demais figuras de méritos se mostraram semelhantes, sendo que a hifenação SLE/LTP- SDME apresenta menor número de etapas.

Ambos métodos podem ser aplicados para a determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de solo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- da SILVA, F. M.; LACERDA, S. B.; JONES JUNIOR, J.; Química Nova, v. 28, 103, 2005.
- 2- SMITH,R.M.; Journal of Chromatography A,1000, v.3, 2003.
- 3- SAITO, Y.;JINNO, K; Journal of Chromatography A,1000,v. 53,2003.
- 4- QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.;Química Nova, v. 24 n. 1, 2001.
- 5- JIN, B.; XIE, L.; GUO, Y.; PANG, G.; Food Research, V. 46, p. 399-409, 2012.
- 6- SMITH, R. M.; Journal of Chromatography, A, 1000, V.3, 2003.
- 7- OLIVEIRA, A. R. M. de; MAGALHAES, I.R. S.; SANTANA, F. J. M. de e BONATO, P. S.; *Química Nova.*, v.31, n.3, p. 637-644, 2008.
- 8- JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F.; Analytical Chemistry., n. 68, v. 2236. 1996.
- 9- XU, L.,Basheer, C. e LEE, H.K.; Journal of Chromatography A, v. 1152, n.1-2, p184-192, 2007.
- 10-AMVRAZI E.G.,TSIROPOULOS,N.G.;Journal of Chromatography A.;1216(45), p. 7630-7638. 2009.
- 11-CARLOS, E. A.; ALVES, R.D.; QUEIROZ, M.E.L.R.; NEVES, A.A.; Journal Brazilian Chemical Society, v.24, p. 1217- 1227, 2013.
- 12-AMVRAZI E.G., TSIROPOULOS N.G.; Journal of Chromatography A.; v.1216, n.14,p.2789-2797. 2009.
- 13-CHAMSAZ, M., ARBAD-ZAVAR, M.H, NAZARI S.;Journal Analytical Atom Spectrometric. V.18, p.1279-1285, 2003.
- 14-BRASIL, Portaria 2914, Ministério da Saúde, 2011, Brasília
- 15-JEANNOT,M.A.,PRZYJAZNY,A. e KOKOSA,J.M.; Journal of Chromatography A, v.1217, n.16, p.2326-2336,2010.
- 16-MALTEZ,H.F., Desenvolvimento de metodologias analíticas baseadas em

- sistemas de pré-concentração empregando extração em fase sólida e microextração com gota única para determinação de metais-traço em amostras aquosas ambientais. 2007.115f Tese de Doutorado.Universidade Federal de Santa Catarina.Santa Catarina.2007.
- 17- GOULART, S.M.; QUEIROZ, M.E.L.R.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, J.H.; Talanta, v.75, p.1320-1323,2008.
- 18-CARLOS, Elenice Aparecida, Determinação simultânea de trialometas e agrotóxicos em água empregando microextração em fase sólida e microextração em gota única por cromatografia gasosa. 2011. 71f. Tese (Doutorado em agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.
- 19- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Controlando Agrotóxicos nos Alimentos: o trabalho desenvolvido pela ANVISA, com as vigilâncias sanitárias dos estados do AC, ES, GO, MG, MS, PA, PE, PR, RJ, RS, SC, SP, TO, a FIOCRUZ/INCQS e os laboratórios IAL/SP, IOM/FUNED, LACEN/PR E ITEP/PE. Relatório de atividades 2001-2004, Brasília, 2005.
- 20-INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. 2007.
- 21- RIBANI, M.;BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.;MELO, L.F.C.; Química Nova, São Paulo, SP, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.
- 22-BRITO N.M., Amarante Júnior OP, Polese L, Ribeiro ML. ; Pesticidas 2003; 13(dez/jan):129-46.
- 23-BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica. Brasília: MAPA/ACS, 2011.
- 24-CORTADA, C.; VIDAL, L.; TEJADA, S.; CANALS, A.; Analytica Chimica Acta, v.638, p.29-35, 2009.
- 25-AHMADI, F.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, S.M.R.M.; REZAEI, M.; Journal of

- Chromatography A; v.1101, p. 307-3012, 2006.
- 26-PASCHOAL, J. A. R ; Química Nova, São Paulo, SP, v.31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.
- 27-ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Brasília, DF, 2003.
- 28-PINHEIRO, A.,S.; de ANDRADE, J.B.;Talanta, v.79, p.1354-1359, 2009.
- 29- ARIAS-ESTÉVEZ, M.; PERIAGO-LÓPEZ,E.; MARTÍNEZ-CARVALHO,E.; SIMAL-GÁNDARA,J.; MEJUTO, J.C.;RÍO-GARCÍA,L.;Agriculture, Ecosystems and Environment, v. 123, p. 247-260, 2008.
- 30-LOURENCETTI, C.; MARCHI, M. R. R. D.; RIBEIRO, M.;Talanta, v. 77, p. 701-709, 2008.
- 31-GOULART, S. M., Extração de Deltametrina e Cipermetrina de Leite e Análise por Cromatografia Gasosa. 2003. 60f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2003.
- 32-DARDENGO, R.P.; GOULART, S.M.; NEVES, A.A.; REIS, C.; ZAMBOLIM,L.; QUEIROZ,M.E.L.R.; Brazilian Journal Analytical Chemistry, v.03, p136-142, 2011.
- 33-PUSSENTE, Igor Cabreira, Extração sólido-líquido e partição em baixa temperatura (ESL-PBT) de clorpirifós, thiametoxam e deltametrina em maçã e análise por cromatografia gasosa. 2008. 73f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.
- 34-COSTA, Elisa Helena, Análise multirresíduo de agrotóxicos em abacaxi por cromatografia gasosa. 2010. 102f. Dissertação (Mestrado em agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.
- 35-PINHO, G.P.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, M.E.L.R.; SILVÉRIO, F.O. Food Chemistry, v.121, p. 251-256, 2010.
- 36-SOARES, Carlos Eduardo dos Santos, Extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura e seu emprego na análise multirresíduos de agrotóxicos em

- uva e derivados. 2011. 88f. Dissertação (Mestrado em agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.
- 37-COSTA, Anna Isabel Guido, Análise multirresíduo em alface por cromatografia gasosa. 2011. 99f. Dissertação (Mestrado em agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.
- 38-HELENO, F.F.; QUEIROZ, M.E.L.R.; NEVES, A.A.; OLIVEIRA, A.F.; Química Nova, v.37, p.153-157, 2014.
- 39-GERECKE, A.C.; TIXIER,C.; BARTELS, T.; SCHWARZENBACH, R.P.; MULLER, S.R. ,Journal of Chromatography A , v.930, p. 9–19, 2001.
- 40-VIEIRA, Heulla Pereira, Otimização e validação da extração simultânea de piretróides em água e solo e análise por cromatografia gasosa . 2005. 65f. Dissertação (Mestrado em agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.
- 41-SALEMI, A.; RASOOLZADEH, R.; NEJAD, R.R.M.;VOSOUGH, M.; Analytica Chimica Acta, v.769, p.121-126, 2013.
- 42-ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.J.; ŠTAJNBAHER, D.; SCHENCK, F.J.. Journal of AOAC International , v.86,p. 412-431, 2003
- 43-DONG, F.; LIU,X.; CHENG, L.; CHEN, W.; LI, J.; QIN, D.; ZHENG, Y.; Journal of Separation Science, v. 32, p. 3692-3697, 2009.
- 44-ROUVIÈRE, F.; BULETÉ, A.; CREN-OLIVÉ, C.; ARNAUDGUILHEM, C.; Talanta, v.93, p. 336-344, 2012.
- 45-DANKYI,E.;GORDON, C.; FOMSGAARD, I.S.; Science of the Environment, v.499, p. 276-283, 2014.
- 46-SOUSA, F. A.; COSTA, A. I. G.; QUEIROZ, M.E.L.R.; TÉOFILO, R.F.; NEVES, A.A.; PINHO, G.P; Food Chemistry, v.135, p. 179 – 185, 2012