

LUIZ MANOEL SILVA DE NORONHA

**HIFENAÇÃO DAS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM
PARTIÇÃO A BAIXA TEMPERATURA (SLE/LTP) E MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-
LÍQUIDO DISPERSIVA COM SOLVENTE DE BAIXA DENSIDADE (LDS/DLLME)
PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM SOLOS POR GC/ECD**

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
2014

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

T

N852h
2014
Noronha, Luiz Manoel Silva de, 1971-
Hifenação das técnicas de extração sólido-líquido com
partição a baixa temperatura(SLE/LTP) e microextração
líquido-líquido dispersiva com solvente de baixa densidade
(LDS/DLLME) para determinação de agrotóxicos em solos
por GC/ECD / Luiz Manoel Silva de Noronha. - Viçosa, MG,
2014.

xiv, 89f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Antônio Augusto Neves.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.77-89.

1. Química agrícola. 2. Produtos químicos agrícolas.
3. Compostos organofosforados. 4. Microextração.
5. Solvente. 6. Solos. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Química. Programa de Pós-graduação em
Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 668.6

LUIZ MANOEL SILVA DE NORONHA

**HIFENAÇÃO DAS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM
PARTIÇÃO A BAIXA TEMPERATURA (SLE/LTP) E MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-
LÍQUIDO DISPERSIVA COM SOLVENTE DE BAIXA DENSIDADE (LDS/DLLME)
PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM SOLOS POR GC/ECD**

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: 12 de dezembro de 2014.

Clésia Cristina Nascentes

Maurício Xavier Coutrim

André Fernando de Oliveira
(Coorientador)

Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz
(Coorientadora)

Antônio Augusto Neves
(Orientador)

*Aos meus pais Pedro e Eugenia, e meus
irmãos Luciano e Rina*

*Tudo acontece na hora certa.
Tudo acontece, exatamente quando deve acontecer!*
(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter permitido que eu chegasse até onde cheguei.

À UFV, ao DEQ e ao curso de Pós-Graduação em Agroquímica e à FAPEMIG, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho de pesquisa e concessão da bolsa de estudos.

Aos professores e amigos Antônio Augusto, Maria Eliana e André Fernando, pela orientação, confiança e incentivo, durante a realização deste trabalho, além do carinho e amizade nesse período.

Aos meus pais Pedro e Eugenia, meus irmãos Luciano e Rina, Elaine e Ana Luiza pelo carinho, amizade e suporte emocional ao longo do curso e suas adversidades.

Aos professores José Humberto, Claudio Lima, Sergio, Claudio Mafra, Cesar, Efrain, Demuner, Renata, Belatto, Reinaldo, Varejão, Anízio (UFU) entre outros pela atenção e amizade ao longo do curso. À Professora Maria de Fatima F. Lellis, da UFES, pela participação na banca de qualificação.

À Carlos e Marta, Raquel e Gino, Eveline e Wellington, Beto e Rafa, pelo carinho e amizade de sempre

Aos amigos do LAQUA, Adley, Carlos Eduardo Andrade, Carlos Eduardo Soares, Gustavo, Ronan, Anna Isabel, Flaviane, Fernanda, Renata, Isadora, Cristiane, Cyntia, Elenice, Simone, Elisa, Livia, Raquel, Bethania, Alessandra, Robson, Nelson, Marcos Rafael, Adriana, Ághata, Luiz Felipe, Laurence, Nívia, Fran, Gleyci, Mariane, Mariane Ávila, Eduarda, Mariana, Mayara, Luiz Philip, Thais, Camila, Jéssika, Vitor, Roberta e Renan, que estiveram comigo nessa caminhada, me ensinando e participando de alguma forma, da minha formação, além daqueles que eu me esqueci de mencionar (desculpem).

Aos amigos Henrique, Tiago Toledo, José Neto, Fabiano, Jorge, Gabriel, José Luiz, Ricardo Martins, Ruy, e tantos outros que com sua presença tornaram essa caminhada mais divertida.

Aos meus grandes amigos Toni, Moacir, Matuzael, Mauro e Marcos Vander, que mostraram que amigo não precisa estar perto. E os Lost Riders Denilson, Fredin, Malafaia e Michel, que mesmo de longe me ajudaram a enfrentar as dificuldades.

BIOGRAFIA

LUIZ MANOEL SILVA DE NORONHA, filho de Pedro Luiz de Noronha e Eugenia Silva de Noronha, nasceu em Vitória, Espírito Santo, em 05 de agosto de 1971, onde cursou seus estudos até o segundo grau, formando-se técnico em Química, em 1988. Em 1989 estagiou no laboratório de pelotização da Cia. Vale do rio Doce e em 1990 ingressou no Curso de graduação em Química, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde se diplomou Bacharel, em fevereiro de 1995.

Em 1995 assumiu como professor substituto da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), nos cursos de Engenharia Civil e Engenharia Mecânica, na sede em Vitória, e Licenciatura em Ciências Biológicas, na unidade de São Mateus, norte do ES, até Julho de 1996. A partir de agosto de 1996, realizou estagiou por seis meses na Universidade de São Paulo (USP), na área de química inorgânica de lantanídeos. Em 1997 iniciou o curso de pós-graduação *Lato Sensu* em Comercio exterior, na Universidade de Vila Velha (UVV), concluindo-o em 1999.

Trabalhou no setor de compras da Aracruz Celulose – unidade ARCEL, de 1997 a 1998. Atuou como químico responsável pelo laboratório de monitoramento ambiental no complexo portuário de Tubarão, de 1999 até 2000, quando iniciou a pós-graduação *Lato Sensu* em Engenharia de Meio Ambiente, oferecida pela UFES. Em 2001, inicia seu mestrado em Engenharia Ambiental, também pela UFES, defendendo sua dissertação em fevereiro de 2004, na área de Recursos Hídricos. Concomitantemente ao mestrado, realiza alguns trabalhos de consultoria e inicia carreira de professor universitário na UVV, em Vila Velha, ES, atuando nos cursos de Engenharia de Produção e Medicina Veterinária.

Em 2004 começou a trabalhar na CETREL, na filial do ES, no contrato de monitoramento ambiental do complexo portuário da VALE, no Espírito Santo, liderando a equipe de monitoramento ambiental responsável por toda a área da VALE até 2006.

Em 2006, tornou-se professor universitário em tempo integral na UVV, atuando nos cursos de Engenharia de Produção e Metalurgia, Medicina Veterinária e Zootecnia, Além dos cursos de Biologia e Nutrição, sendo responsável pelo desenvolvimento da disciplina de química virtual, no projeto de EAD da instituição. Em 2007, tornou-se coordenador do curso de Gestão Ambiental, sendo responsável pela sua implantação e consolidação, ficando nessa função até julho de 2009, quando deixou a instituição para cursar seu doutorado. Em Agosto de 2009, iniciou o curso de Pós-Graduação em Agroquímica, em nível de Doutorado, na Universidade Federal de Viçosa, retornando para o grupo LAQUA, onde realizou seus experimentos e estudos, defendendo a tese em dezembro de 2014. Nesse período, trabalhou no CEAD/UFV e deu aula no Instituto Federal de Minas Gerais, campus Ouro Preto como professor temporário por quatro meses.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO GERAL	1
1. AGROTÓXICOS	1
2. SOLO	3
3. SISTEMAS DE EXTRAÇÃO EM ANÁLISES QUÍMICAS	5
CAPÍTULO 1 – OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DLLME PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS ORGANOFOSFORADOS E PIRETRÓIDES EM ÁGUA	9
1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
5. CONCLUSÃO	48
CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICA DE EXTRAÇÃO SLE/LTP HIFENADA COM A TÉCNICA LDS/DLLME PARA AGROTÓXICOS ORGANOFOSFORADOS E PIRETRÓIDES EM AMOSTRAS DE SOLO	49
1. INTRODUÇÃO	49
2. OBJETIVOS	52
3. MATERIAIS E MÉTODOS	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5. APLICAÇÃO EM SOLOS AGRÍCOLAS	71
6. CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	77

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: CROMATOGRAMA OBTIDO PELA INJEÇÃO DE PADRÕES DE AGROTÓXICOS PREPARADOS EM SOLVENTE TOLUENO, NA CONCENTRAÇÃO DE 250 $\mu\text{G L}^{-1}$.	27
FIGURA 2: GRÁFICO COMPARATIVO ENTRE A MASSA MOLAR E O TEMPO DE RETENÇÃO DOS AGROTÓXICOS AVALIADOS, CONFORME DADOS DA TABELA 1.	29
FIGURA 3: GRÁFICO COMPARATIVO ENTRE A MASSA MOLAR E O TEMPO DE RETENÇÃO DOS AGROTÓXICOS AVALIADOS, CONFORME DADOS DA TABELA 6.	30
FIGURA 4: RESPOSTAS CROMATOGRÁFICAS DOS ANALITOS PARA EXTRATOS OBTIDOS PELA TÉCNICA LDS/DLLME NOS ENSAIOS COM SOLVENTES EXTRATORES DIFERENTES.	31
FIGURA 5: RESPOSTAS CROMATOGRÁFICAS DOS ANALITOS PARA EXTRATOS OBTIDOS PELA TÉCNICA LDS/DLLME NOS ENSAIOS COM AGITAÇÃO MANUAL E AGITAÇÃO POR VORTEX.	32
FIGURA 6: RESPOSTAS CROMATOGRÁFICAS DOS ANALITOS EM EXTRATOS OBTIDOS PELA TÉCNICA LDS/DLLME NOS ENSAIOS COM SOLVENTES DISPERSORES VARIADOS.	34
FIGURA 7: RESPOSTAS CROMATOGRÁFICAS DOS ANALITOS EM EXTRATOS OBTIDOS PELA TÉCNICA LDS/DLLME NOS ENSAIOS COM PLANEJAMENTO FATORIAL 2^2 PARA TEMPO DE AGITAÇÃO E VELOCIDADE DE AGITAÇÃO.	35
FIGURA 8: RESPOSTAS CROMATOGRÁFICAS DOS ANALITOS EM EXTRATOS OBTIDOS PELA TÉCNICA LDS/DLLME NOS ENSAIOS COM PLANEJAMENTO FATORIAL 2^2 PARA VOLUME DO SOLVENTE EXTRATOR E VOLUME DO SOLVENTE DISPERSOR.	37
FIGURA 9: CROMATOGRAMA DO TOLUENO PURO (A) COMPARADO COM CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE AGROTÓXICOS EM TOLUENO (B).	40
FIGURA 10: CROMATOGRAMA DO EXTRATO OBTIDO PELO PROCESSO DE EXTRAÇÃO LDS/DLLME DE UMA AMOSTRA DE CONCENTRAÇÃO 5XLQ (C) COMPARADO COM O CROMATOGRAMA DO EXTRATO OBTIDO PELO MESMO PROCESSO DE UMA AMOSTRA ISENTA DE AGROTÓXICOS (D).	41
FIGURA 11: GRÁFICO DE RESÍDUOS NORMALIZADOS PARA A CURVA ANALÍTICA DA PARATIONA-METÍLICA EM AMOSTRAS DE ÁGUA EXTRAÍDAS PELO MÉTODO LDS/DLLME.	43
FIGURA 12: ESQUEMA DA MICROTÉCNICA LDS/DLLME APLICADA EM AMOSTRAS AQUOSAS.	47
FIGURA 13: ÁREAS DAS RESPOSTAS CROMATOGRÁFICAS DOS ANALITOS PARA EXTRATOS OBTIDOS PELA TÉCNICA SLE/LTP NOS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 COM PONTO CENTRAL PARA OS FATORES V_T , R_1 E R_2 .	59

FIGURA 14: RESPOSTAS CROMATOGRÁFICAS DOS ANALITOS PARA VARIAÇÃO DE VOLUMES DO EXTRATO ORGÂNICO OBTIDO NA ETAPA DE EXTRAÇÃO SLE/LTP, APLICADO COMO SOLVENTE DISPERSOR NA ETAPA LDS/DLLME.....	62
FIGURA 15: CROMATOGRAMA DO EXTRATO DA AMOSTRA DE SOLO ISENTO DE AGROTÓXICOS (A) COMPARADO COM CROMATOGRAMA DO EXTRATO DA AMOSTRA DE SOLO FORTIFICADA COM PADRÕES DE AGROTÓXICOS NA CONCENTRAÇÃO DE 4LQ (B), APÓS EXTRAÇÃO PELO MÉTODO SLE/LTP – LDS/DLLME.....	64
FIGURA 16: GRÁFICO DE RESÍDUOS NORMALIZADOS PARA A CURVA ANALÍTICA DA PARATIONA-METÍLICA EM AMOSTRAS DE SOLO EXTRAÍDAS PELO MÉTODO SLE/LTP - LDS/DLLME.....	66
FIGURA 17: ESQUEMA DA APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE SLE/LTP-LDS/DLLME PARA AMOSTRAS DE SOLO.	70
FIGURA 18: COMPARAÇÃO ENTRE DUAS AMOSTRAS DE SOLOS DISTINTOS, EM TRÊS NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO, PARA O AGROTÓXICO PARATIONA METÍLICA. Y_1: EQUAÇÃO DA RETA PARA O SOLO VIÇOSA; Y_2: EQUAÇÃO DA RETA PARA O SOLO CERRADO.....	73
FIGURA 19: COMPARAÇÃO ENTRE DUAS AMOSTRAS DE SOLOS DISTINTOS, EM TRÊS NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO, PARA O AGROTÓXICO PROFENOFÓS. Y_1: EQUAÇÃO DA RETA PARA O SOLO VIÇOSA; Y_2: EQUAÇÃO DA RETA PARA O SOLO CERRADO.	73
FIGURA 20: COMPARAÇÃO ENTRE DUAS AMOSTRAS DE SOLOS DISTINTOS, EM TRÊS NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO, PARA O AGROTÓXICO BIFENTRINA. Y_1: EQUAÇÃO DA RETA PARA O SOLO VIÇOSA; Y_2: EQUAÇÃO DA RETA PARA O SOLO CERRADO.	74
FIGURA 21: COMPARAÇÃO ENTRE DUAS AMOSTRAS DE SOLOS DISTINTOS, EM TRÊS NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO, PARA O AGROTÓXICO LAMBDA-CIALOTRINA. Y_1: EQUAÇÃO DA RETA PARA O SOLO VIÇOSA; Y_2: EQUAÇÃO DA RETA PARA O SOLO CERRADO.	74
FIGURA 22: COMPARAÇÃO ENTRE DUAS AMOSTRAS DE SOLOS DISTINTOS, EM TRÊS NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO, PARA O AGROTÓXICO CIPERMETRINA. Y_1: EQUAÇÃO DA RETA PARA O SOLO VIÇOSA; Y_2: EQUAÇÃO DA RETA PARA O SOLO CERRADO.	75
FIGURA 23: COMPARAÇÃO ENTRE DUAS AMOSTRAS DE SOLOS DISTINTOS, EM TRÊS NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO, PARA O AGROTÓXICO DELTAMETRINA. Y_1: EQUAÇÃO DA RETA PARA O SOLO VIÇOSA; Y_2: EQUAÇÃO DA RETA PARA O SOLO CERRADO.	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – AGROTÓXICOS UTILIZADOS NA OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA LDS/DLLME.....	19
TABELA 2 - CONDIÇÕES INICIAIS DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO LDS/DLLME	23
TABELA 3 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS SOLVENTES EXTRATORES TESTADOS	23
TABELA 4 - PLANEJAMENTO FATORIAL 2^2 COM DUPLICATA NO PONTO CENTRAL PARA OS FATORES TEMPO DE AGITAÇÃO E VELOCIDADE DE AGITAÇÃO NO VORTEX.....	24
TABELA 5 - PLANEJAMENTO FATORIAL 2^2 COM TRIPLICATA NO PONTO CENTRAL PARA OS FATORES VOLUME DO SOLVENTE EXTRATOR E VOLUME DO SOLVENTE DISPERSOR	24
TABELA 6 - TEMPOS DE RETENÇÃO DOS AGROTÓXICOS NAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS OTIMIZADAS.....	28
TABELA 7 - COEFICIENTES DE VARIAÇÃO DAS RESPOSTAS CROMATOGRÁFICAS OBTIDAS NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO LDS/DLLME DOS ANALITOS POR AGITAÇÃO MANUAL E AGITAÇÃO VORTEX.....	32
TABELA 8 - EFEITOS SIGNIFICATIVOS OBTIDOS NOS ENSAIOS COM PLANEJAMENTO FATORIAL 2^2 PARA TEMPO DE AGITAÇÃO E VELOCIDADE DE AGITAÇÃO, NA TÉCNICA LDS/DLLME.....	36
TABELA 9 - EFEITOS SIGNIFICATIVOS OBTIDOS NOS ENSAIOS COM PLANEJAMENTO FATORIAL 2^2 PARA VOLUME DE SOLVENTE EXTRATOR E VOLUME DE SOLVENTE DISPERSOR, NA TÉCNICA LDS/DLLME.	38
TABELA 10 - CONDIÇÕES OTIMIZADAS PARA O PROCESSO DE EXTRAÇÃO LDS/DLLME.....	38
TABELA 11 - VALORES DE LOD, LOQ, COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO, EQUAÇÃO DA RETA E EF (FATOR DE ENRIQUECIMENTO) PARA CADA AGROTÓXICO ANALISADO PELO MÉTODO LDS/DLLME-GC/ECD.....	42
TABELA 12 - VALORES DE REPETITIVIDADE E RECUPERAÇÃO PARA OS ANALITOS VALIDADOS – 1º DIA	45
TABELA 13 - VALORES DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA E EXATIDÃO APÓS 3 DIAS DE AVALIAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE PARA OS ANALITOS VALIDADOS.....	46
TABELA 14 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 COM PONTO CENTRAL (5 PONTOS) – VALORES REAIS E FATORES CODIFICADOS.	56
TABELA 15 - EFEITOS SIGNIFICATIVOS OBTIDOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 COM PONTO CENTRAL PARA CADA ANALITO, NA TÉCNICA SLE/ LTP.....	60
TABELA 16 - CONDIÇÕES OTIMIZADAS E VALIDADAS DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO SLE/LTP - LDS/DLLME.....	62

TABELA 17 - VALORES DE LOD, LOQ, COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO, EQUAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA E EF (FATOR DE ENRIQUECIMENTO) PARA CADA ANALITO VALIDADO.	65
TABELA 18 - VALORES DE REPETITIVIDADE E PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE PROPOSTO – 1º DIA	68
TABELA 19 - VALORES DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA DO MÉTODO AO LONGO DE 3 DIAS PARA OS ANALITOS VALIDADOS	69
TABELA 20: ANÁLISE TEXTURAL DOS SOLOS UTILIZADOS NA APLICAÇÃO DO MÉTODO HIFENADO.....	71
TABELA 21: CONCENTRAÇÃO E % DE RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS NOS SOLOS SUBMETIDOS AO PROCESSO DE EXTRAÇÃO SLE/LTP-LDS/DLLME .	72

LISTA DE ABREVIATURAS

ASE	Acelerated Solvent Extraction (Extração por Solvente Acelerado)
GC	Gas Chromatography (Cromatografia Gasosa)
GC/MS	Gas Chromatography with Mass Spechtometry (Cromatografia Gasosa com Detecção por Espectrometria de Massas)
CV	Coeficiente de Variação
DAD	Diodo Array Detector (Detector por Arranjo de Diodo)
dSPE	dispersive Solid Phase Extraction (extração em fase sólida dispersiva)
ECD	Electron Capture Detector (Detector por Captura de Elétrons)
EF	Enrichment Factor (Fator de Enriquecimento)
DLLME	Dispersive Líquid-Líquid Microextraction (Microextração Líquido-Líquido Dispersiva).
DLLME/SFO	Dispersive Líquid-Líquid Microextraction with solidification of floating organic drop (Microextração Líquido-Líquido Dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante)
GAC	Green Analytical Chemistry (Química analítica Verde)
HF-LPME	Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction (Microextração em Fase Líquida com Fibra Protegida)
HPLC	High Performance Líquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HS-SPME	Head-Space solid Phase Microextraction (microextração em fase sólida no modo headspace)
LC	Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida)
LDS/DLLME	Low-density solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction (Microextração Líquido-Líquido Dispersiva com solvente menos denso que a água)
LLE	Liquid-Liquid Extraction (Extração Líquido-Líquido)
LLME	Liquid Liquid Microextraction (Microextração Líquido-Líquido)
LOD	Limit of Detection (Limite de Detecção)
LOQ	Limit of Quantification (Limite de Quantificação)
LPME	Liquid Phase Microextraction (Microextração em Fase Líquida)
MAE/MASE	Microwave Assisted Solvent Extraction (Extração Assistida por Microondas)
MSPD	Matrix Solid Phase Dispersive (Dispersão da matriz em fase sólida)
RSD	Residue standard deviation (desvio padrão residual)
SDME	Single Drop Microextraction (Microextração em Gota Única)
SFE	Supercritic Fluid Extraction (Extração por Fluido Supercrítico)
SLE	Sólid-Liquid Extraction (Extração Sólido-Líquido)
SLE/LTP	Solid Phase Extraction with Low Temperatura Partition (Extração Líquido-Líquido com Partição a Baixa Temperatura)
SPE	Solid Phase Extraction (Extração em Fase Sólida)
SPME	Solid Phase Microextraction (Microextração em Fase Sólida)
PLE	Pressurized Liquid Extraction (Extração Líquida Pressurizada)
PIR	Piretróides
t_R	Tempo de Retenção
USE	Ultrasonic Solvent Extraction (extração com solvente ultrassonicado)

RESUMO

NORONHA, Luiz Manoel Silva de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2014. **HIFENAÇÃO DAS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO A BAIXA TEMPERATURA (SLE/LTP) E MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA COM SOLVENTE DE BAIXA DENSIDADE (LDS/DLLME) PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM SOLOS POR GC/ECD.** Orientador: Antônio Augusto Neves. Coorientadores: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz e André Fernando de Oliveira.

Procedimentos de extração baseados nos princípios da química verde tem sido desenvolvidos desde 1990, com a miniaturização tendo um papel importante. A combinação da técnica extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) e a microextração líquido-líquido dispersiva com solvente de baixa densidade (LDS/DLLME), juntamente com a cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (GC/ECD) foi utilizada para a determinação de 2 agrotóxicos organofosforados e 4 piretróides em amostras de solo. O extrato contendo os analitos da etapa SLE/LTP foi empregado na etapa LDS/DLLME, substituindo o solvente dispersor dessa etapa. No processo otimizado, a acetonitrila foi selecionada como o solvente da etapa SLE/LTP (e também como solvente dispersor da etapa LDS/DLLME), e tolueno foi usado como o solvente de extração. Na validação do método, os valores das recuperações da extração ficaram na faixa de 87,6-102,5%, os limites de quantificação (LOQ) ficaram entre 3,0 e 10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e os valores de desvio padrão relativo (RSD) ficaram entre 5,6 e 19,2%. A técnica otimizada e validada foi aplicada em dois solos diferentes. Os valores de RSD obtidos ficaram na faixa de 1,9-20,1% (solo 1) e 1,4-20,5% (solo 2), e as recuperações ficaram entre 98,0-117,7% (solo 1) e 108,0-173,5% (solo 2), nos níveis de fortificação avaliados. A técnica hifenada se mostrou interessante por unir as vantagens de *clean-up* e simplicidade da técnica de extração SLE/LTP e da simplicidade, rapidez, baixo custo e alto fator de pré-concentração da técnica LDS / DLLME na determinação de agrotóxicos no solo.

ABSTRACT

NORONHA, Luiz Manoel Silva de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, december, 2014. **HYPHENATION OF TECHNIQUES SOLID-LIQUID EXTRACTION WITH LOW TEMPERATURE PARTITION (SLE/LTP) AND LOW-DENSITY SOLVENT DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION (LDS/DLLME) FOR DETERMINATION OF PESTICIDES IN SOIL BY GC/ECD.** Adviser: Antônio Augusto Neves. Co-advisers: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz e André Fernando de Oliveira.

Extraction procedures based on the principles of green chemistry have been under development since the 1990s, with miniaturization playing an important role. Here, a combination of solid-liquid extraction with low-temperature partitioning (SLE/LTP) and low-density solvent dispersive liquid-liquid microextraction (LDS/DLLME) techniques, coupled with gas chromatography with electron capture detection (GC/ECD), was used to determine two organophosphorus and four pyrethroid pesticides in soil samples. The extract containing the analytes from the SLE/LTP step was employed in the LDS/DLLME step, substituting the dispersive solvent. The SLE/LTP step and LDS/DLLME step were optimized using factorial and univariate designs. In the optimized procedure, acetonitrile was selected as the SLE/LTP solvent (and also as DLLME dispersive solvent), and toluene was used as the extraction solvent. The extraction recoveries were in the range 87.6 - 102.5 %, and the limits of quantification (LOQ) were between 3.0 and 10.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The relative standard deviation (RSD) values were between 5.6 and 19.2 %. The optimized and validated technique was applied to two different soil samples. The RSD values obtained were in the ranges 1.9-20.1% (Soil 1) and 1.4-20.5% (Soil 2), and the recoveries were 98.0 - 117.7 % (Soil 1) and 108.0 - 173.5% (Soil 2), at the fortification levels employed. The hyphenated method was interesting for coupling the advantages of clean-up and extraction technique (SLE/LTP) and of the simple, fast, cheap and high pre-concentration rate microextraction (LDS/DLLME) in determination of pesticides in soil.

INTRODUÇÃO GERAL

1. AGROTÓXICOS

Os agrotóxicos são substâncias utilizadas no controle de pragas na produção de alimentos (agricultura e pecuária), de forma intensiva, desde o início do século XX (OPAS/OMS, 1997). No Brasil, o decreto-lei nº 4.074/02, define agrotóxicos como substâncias ou conjunto de substâncias destinadas a prevenir, destruir ou repelir qualquer forma de agente patogênico de vida animal ou vegetal, que seja nociva ao meio ambiente e ao homem, (BRASIL, 2002). Historicamente, agrotóxicos são utilizados pelo homem desde o início das civilizações, porém, no início dos anos 50, produtos químicos inorgânicos, como arseniato de cálcio, sulfato de cobre e arseniato de enxofre ainda eram utilizados, sendo substituídos por compostos orgânicos nos anos subsequentes (PLIMMER, 2001). Atualmente são utilizados no mundo, aproximadamente 500 ingredientes ativos, sendo que a maior parte é de herbicidas, inseticidas e fungicidas (ZHANG *et al.*, 2011). A partir de 2008, o Brasil tornou-se o maior mercado consumidor de agrotóxicos, onde os herbicidas, inseticidas e fungicidas também são, nessa ordem, os agrotóxicos mais vendidos (IBAMA, 2010).

Esses agrotóxicos podem ser classificados com base em sua finalidade (herbicidas, inseticidas, fungicidas, acaricidas, etc), toxicidade (classe I, classe II, classe III e classe IV) ou em sua composição química (organofosforados, piretróides, carbamatos, triazinas, etc) (WHO, 2009; BAIRD & CANN, 2011).

Os inseticidas são muito utilizados, pois atuam no combate de insetos que atacam plantações, animais e o próprio homem. Dos grupos de ingredientes ativos mais utilizados no combate aos insetos estão os agrotóxicos organofosforados, considerados os substitutos dos organoclorados (SALEMI *et al.*, 2013) e os piretróides, que possuem largo espectro de atuação e são considerados o quarto maior grupo de inseticidas (GONÇALVES & ALPENDURADA, 2002; LIU *et al.*, 2010).

Agrotóxicos organofosforados foram produzidos a partir do início do século XX, mas seu potencial tóxico foi determinado nos anos 30, e nos anos 40 foram produzidos como agentes químicos na guerra (CHAMBERS *et al.*, 2001a), sendo ainda hoje importantes no combate à insetos. Estes agrotóxicos são ésteres

derivados de ácido fosfórico com diferentes substituintes (PAGLIUCA *et al.*, 2005), sendo considerados menos persistentes que os organoclorados, porém, apresentam em sua maioria, um elevado efeito tóxico agudo para seres humanos e outros mamíferos (PENA *et al.*, 2003). Diversas combinações para novos compostos podem ocorrer pela substituição dos átomos de oxigênio ligados ao átomo de fósforo por átomos de enxofre (S) ou nitrogênio (N), podendo ocorrer até 32 combinações, se levarmos em conta não só o ácido fosfórico como também o ácido fosforoso (CHAMBERS *et al.*, 2001a). O mecanismo de ação dos organofosforados se dá pela inibição irreversível de enzimas colinesterases, especialmente a acetilcolinesterase (USEPA, 2013). Essa enzima atua no sistema nervoso central de vertebrados e sua inibição pelos organofosforados resulta na morte dos mamíferos por insuficiência respiratória. Devido à complexidade das moléculas dos organofosforados, isso produz rotas de degradação complexas, o que permite que algumas outras enzimas possam ser fosforiladas, mas sem produzir resposta tóxica (CHAMBERS *et al.*, 2001b). Além das colinesterases, alguns grupos de inseticidas organofosforados podem alterar outras enzimas, sendo a principal delas a neurotoxicoesterase, podendo causar neuropatia periférica. (OPAS/OMS, 1997). São exemplos desse grupo químico os agrotóxicos diclorvós, malationa, parationa-metilica, diazinona, forato, metamidofós, clorpirifós e profenofós, dentre outros.

Os agrotóxicos piretróides são compostos sintéticos que apresentam estruturas semelhantes à piretrina, substância existente nas flores do *Chrysanthemum (pyrethrum) cinenariaefolium* (USEPA, 2013). São facilmente absorvidos pelo trato digestivo, vias respiratórias e pele. São pouco tóxicos do ponto de vista agudo, porém podem causar alergias crônicas em crianças e adultos e em altas dosagens podem causar neuropatias (OPAS/OMS, 1997). São exemplos de piretróides muito utilizados a bifentrina, λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina, dentre outros.

Estima-se que 99% dos agrotóxicos aplicados não alcancem o alvo, sendo liberados para o solo, corpos d'água e atmosfera, podendo ser absorvidos por qualquer organismo (ZHANG *et al.*, 2011). O uso demasiado e indiscriminado, associado à persistência destas substâncias no ambiente é motivo de preocupação, uma vez que vários danos causados à saúde humana e aos ecossistemas podem estar relacionados a eles.

Inseticidas organofosforados e piretróides têm sido encontrados em amostras de água (WANG *et al.*, 2009; GONÇALVES & ALPENDURADA, 2002; SILVÉRIO *et al.*, 2012), alimentos (MELO *et al.*, 2012; HO *et al.*, 2013; AKOTO *et al.*, 2013) e solos (SALEMI *et al.*, 2013; FERNANDEZ-ALVAREZ *et al.*, 2008) e a necessidade de desenvolver novos métodos para determinação e detecção desses compostos, com limites de detecção e quantificação adequados à legislação, torna-se urgente, tanto para facilitar a avaliação da contaminação dos compartimentos ambientais, como para comprovar que os limites determinados pela legislação estão sendo cumpridos.

No solo, o destino de agrotóxicos depende da dinâmica química, biológica e física desse tipo de matriz, onde os processos podem ser de dois tipos: os que afetam a persistência, incluindo degradação química microbiana, e aqueles que afetam a mobilidade, envolvendo sorção, volatilização, erosão eólica, escoamento e lixiviação (ANDREU e PICÓ, 2004).

2. SOLO

Solo é um componente da natureza que não possui uma definição unânime, devido à sua multifuncionalidade. Historicamente, muitas definições de solo foram propostas, existindo divergências, principalmente entre agrônomos e geólogos (CERTINI & UGOLINI, 2013). Johnson (1998) define o solo como sendo um material lítico e/ou orgânico na superfície de planetas e corpos semelhantes, alterados por agentes biológicos, químicos e/ou físicos. Certini e Ungolini (2013) citam a Soil Taxonomy (USDA), que define solo como sendo um corpo natural composto de sólidos (minerais e/ou matéria orgânica), líquidos e gases que ocorre na superfície da terra, caracterizada por possuir horizontes, ou camadas, que se distinguem entre si a partir do material inicial, como resultado de adições, perdas, transferências e transformações de energia e matéria podendo possuir capacidade de suportar plantas enraizadas em um ambiente natural. Propõem também uma nova definição de solo contemplando solos de corpos celestes diferentes da terra, onde consideram que o solo é “uma camada espessa ou não consolidada de mineral refinado ou material orgânico com ou sem porções cimentadas ou elementos grosseiros, que se encontra perto da superfície de planetas, luas e asteroides”. A definição de solos no Brasil é dada pela EMBRAPA, no sistema de classificação de solos (EMBRAPA,

2006a) como sendo “uma coleção de corpos naturais, constituídos por partes sólidas, líquidas e gasosas, tridimensionais, dinâmicos, formados por materiais minerais e orgânicos, que ocupam a maior parte do manto superficial das extensões continentais do nosso planeta, contém matéria viva e podem ser vegetados na natureza em que ocorrem e, eventualmente, terem sido modificados por interferências antrópicas”.

Os solos são considerados materiais complexos, pois refletem a variabilidade das rochas e materiais orgânicos que lhes deram forma (McBRIDE, 1994). Os componentes principais de um solo são cascalho (partículas de 2 a 60 mm), areia (partículas de 0,06 a 2 mm), silte (partículas de 0,006 a 0,06 mm) e argila (partículas < 0,002 mm) e a matéria orgânica presente nos solos, que podem se encontrar em vários estádios de decomposição, pode variar de forma considerável, normalmente entre 1 a 95% da composição solo (MANAHAN, 1994). A composição básica do solo é chamada de textura, sendo que, de acordo com as combinações das partículas, podemos ter solos leves (arenosos, com % areia > 70% e % argila <15%), médios (% areia, argila e silte balanceadas) e solo pesado (argiloso, com % argila > 35 %). Quanto à profundidade, os solos podem ser rasos, profundos ou com afloramento de rochas. Essa classificação depende da camada arável do solo (EMBRAPA, 2006b). As frações de silte e areia são compostas de quartzo, feldspato e micas, entre outros minerais, chamados de primários, enquanto as argilas são formadas por óxidos, aluminossilicatos não cristalinos e argilossilicatos em camadas (McBRIDE, 1994). Os solos são formados por camadas distintas, que vão se modificando com o aumento da profundidade. Essas camadas são chamadas de horizontes e a camada superficial é chamada de horizonte A (ou superficial), onde o solo é mais descompactado, com a maior parte da matéria orgânica e atividade biológica ocorrendo nesta camada. O horizonte B, chamado de subsolo, possui maior compactação e pouca ou nenhuma quantidade de matéria orgânica e atividade biológica, e o horizonte C, formado por fragmentos intemperizados da rocha original (MANAHAN, 1994). Uma das funções do solo, além da sustentação dos vegetais é a de filtro químico e biológico, para diminuir o impacto ambiental causado pela introdução acidental de substâncias orgânicas, servindo assim de primeira linha na contenção destes, para a água subterrânea e biosfera (McBRIDE, 1994).

3. SISTEMAS DE EXTRAÇÃO EM ANÁLISES QUÍMICAS

Para identificação química dos contaminantes e componentes do solo é necessário a separação ou extração destes, de forma que suas características e estruturas químicas sejam conservadas, facilitando a identificação. Para compostos inorgânicos, como metais, é comum utilizar-se de dissolução ácida (PAYE *et al.*, 2010). Para compostos orgânicos é comum utilizar processos de extração utilizando-se solventes polares e apolares, de acordo com as características físico-químicas das substâncias de interesse. A técnica de extração originalmente utilizada para compostos orgânicos em solos é a extração sólido-líquido (ESL) tradicional, e a extração sólido-líquido por soxhlet (KJBLHOLT, 1985; PAWLISZYN, 2002). A ESL tradicional é uma técnica de extração onde a amostra entra em contato com o solvente de extração com agitação mecânica (SATTAR, 1990; IBAÑEZ *et al.*, 2005), enquanto a extração por soxhlet é uma extração exaustiva, por refluxo, normalmente com duração de 12 horas ou mais e que utiliza grandes volumes de solvente orgânico (DURAND & BARCELÓ, 1991; PUIG & BARCELÓ, 1994; GIBSON *et al.*, 2005). A energia ultrassônica como forma de agitação em conjunto com solventes também é utilizada na extração de compostos orgânicos em amostras de solos (YASIN *et al.*, 1996; SANCHÉZ-BRUNETE *et al.*, 2002; GONÇALVES & ALPENDURADA, 2005; VEGA *et al.*, 2005). A técnica de extração com auxílio de ultrassom é uma variação da técnica ESL tradicional, onde se pode utilizar um menor volume de solvente extrator, em relação às técnicas tradicionais, e soxhlet. Outra variação da ESL tradicional é o uso de micro-ondas (MASE) como sistema agitador/extrator em auxílio ao solvente utilizado (PAPADAKIS & PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, 2002; ESTEVE-TURRILLAS, 2004; FUENTES *et al.*, 2007). A vantagem do uso de sonicação ou micro-ondas são o menor volume de solvente utilizado, além do menor tempo de extração, em relação à ESL tradicional e ESL por soxhlet. Entretanto, só podem ser aplicados para extração de analitos que sejam estáveis às condições de extração. As técnicas de extração utilizando fluido supercrítico (SFE) e solvente acelerado (ASE ou PLE) são técnicas de extração que se utilizam de alta pressão e temperatura, porém necessitam de equipamentos especiais e conseqüentemente mais caros (HUBERT *et al.*, 2000; ANDREU *et al.* 2007).

O método de extração QuEChERS, originalmente desenvolvido para aplicação em alimentos (FENIK *et al.*, 2011), também foi aplicado para extração de agrotóxicos em solos (DROŹDŹYŃSKI & KOWALSKA, 2009; PINTO *et al.*, 2010) e compostos fenólicos (PADILLA-SÁNCHEZ, *et al.*, 2010). Foi comparado com USE (ultrasonic solvent extraction) e PLE (pressurized liquid extraction), na extração de agrotóxicos em solos, e, apesar de apresentar valores de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) um pouco maiores que as duas técnicas, apresentou melhor recuperação e variação nos resultados (LESUEUR *et al.*, 2008). Outra técnica de extração com baixo uso de solvente utilizada para extração de compostos orgânicos, como agrotóxicos, em solos é a extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP). Assim como QuEChERS, a SLE/LTP também foi desenvolvida para extração de orgânicos em alimentos, principalmente com altos teores de óleos e gorduras (McLEOD & WALES, 1972; LAWRENCE & McLEOD, 1974; LENTZA-RIOS *et al.*, 2001). A técnica SLE/LTP possui como princípio a extração dos analitos de interesse da amostra, por uma mistura de água e um solvente orgânico miscível em água, após agitação. A separação da fase orgânica de interesse ocorre por ação do abaixamento da temperatura, que provoca o congelamento da fase aquosa e a liberação da fase orgânica. Estudos realizados para aplicações em diversos tipos de matrizes apresentaram melhorias tanto na redução dos volumes de solventes utilizados, como também na diminuição do tamanho das amostras (GOULART *et al.*, 2008; PINHO *et al.*, 2010a; PINHO *et al.*, 2010c, RÜBENSAM *et al.*, 2011). A técnica SLE/LTP foi aplicada na extração de agrotóxicos em solos em diversos trabalhos, para inseticidas piretróides (PAULA, 2007; ANDRADE, 2008; PINHO *et al.*, 2010b; RIGUEIRA *et al.*, 2013). Todas estas técnicas apresentam baixa pré-concentração dos analitos extraídos, e são associadas à redução de volume por evaporação por rota-vapor ou pré-concentração e *clean-up* em cartuchos de extração em fase sólida (SPE).

A química analítica verde (GAC – do inglês Green Analytical Chemistry) surge como uma evolução natural da química verde aplicada aos laboratórios de química analítica, cujas diretrizes básicas preveem a redução ou eliminação no uso ou descarte de produtos químicos nocivos à saúde e ao meio ambiente, no desenvolvimento de processos e produtos químicos (MARTEEL *et al.*, 2003; LENARDÃO *et al.*, 2003). A química verde (green chemistry) possui o foco em

produtos e deriva do conceito de engenharia verde (ANASTAS & KIRCHHOFF, 2002) , que tem o foco em processos, sendo esta ultima uma evolução dos conceitos de produção limpa (GLAVIC & LUKMAN, 2007). A química analítica verde prevê a aplicação de três diretrizes básicas da química verde: i) redução de quantidades de solventes em pré-tratamento de amostras; ii) redução da quantidade e toxicidade do solventes e reagentes utilizados nas etapas de análises, especialmente por automação e miniaturização e iii) desenvolvimento de metodologias de análise isentas de solventes ou reagentes (ARMENTA *et al.*, 2008; TOBISZEWSKI *et al.*, 2008).

Desde a década de 90, ou um pouco antes, técnicas de extração com base nos princípios da química analítica verde vêm sendo desenvolvidas e posteriormente aplicadas para análises de solos. As técnicas QuEChErs (ANASTASSIADES *et al.*, 2003) e SLE/LTP (LENTZA-RIOS *et al.*, 2001, GOULART *et al.*, 2008) são considerados técnicas verdes por promoverem a redução de volume de solventes comparativamente com a técnica tradicional ESL.

Além destas, as microtécnicas de extração, tais como a SPME - microextração em fase sólida (ARTHUR & PAWLISZYN, 1990), a SDME – microextração por gota única (JEANNOT; CANTWELL, 1996), a HF-LPME - microextração em fase líquida com fibra protegida (SHEN & LEE, 2002) e a microextração líquido-líquido dispersiva, de sigla DLLME (REZAEI *et al.*, 2006) também se enquadram nos conceitos e premissas da química analítica verde, porém devido às suas características, não possuíam aplicabilidade em amostras sólidas como alimentos e solos e, assim, tornou-se necessário a implantação de etapas de pré-extração. Podemos citar como exemplo de microtécnica de extração a microextração em fase sólida (SPME), que pode ser aplicada indiretamente para amostras de solos, no modo *head-space* (FROMBERG *et al.*, 1996; MOHAMMADI *et al.*, 2009), ou aplicada de forma direta no extrato obtido em etapa de pré-extração (DOONG & LIAO, 2001; FERNANDEZ-ALVAREZ *et al.*, 2008); a microextração em gota única (SDME) que necessita ao menos de uma pequena diluição em solução aquosa para que a extração possa ser realizada (SALEMI *et al.*, 2013; FERNANDES *et al.*, 2012) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), a qual necessita de uma etapa de pré-extração, pois a pequena quantidade de solvente extrator utilizada na técnica seria absorvida pelo solo, impedindo a separação das fases, e

consequentemente, a extração dos analitos de interesse. Dependendo do tipo de composto orgânico a ser extraído, pode-se utilizar água como solvente da etapa de pré-extração (XIONG & HU, 2008), solução aquosa de HCl 0,1 mol/L (WU *et al.*, 2009a), acetona (HU *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2009b), fluido supercrítico (CO₂) (NAEENI *et al.*, 2011), metanol puro (FU *et al.*, 2009) ou solução de metanol em água (60%) (DONG *et al.*, 2013). Também pode ser aplicada uma etapa de pré-extração em fase sólida dispersiva (MSPD) onde o solo é misturado, desfragmentado e homogeneizado em um sorvente sólido (C18, florisil, sílica, etc), e em um cartucho semelhante ao utilizado em SPE, posteriormente eluído por um solvente adequado, sendo o eluato aplicado da etapa DLLME (WANG *et al.*, 2012). Nesses processos de extração, em conjunto com os solventes, podem ser aplicadas técnicas de agitação como mesa agitadora (WU *et al.*, 2009a; FU *et al.*, 2009), ultrassom (XIONG & HU, 2008; ASENSIO-RAMOS *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012), entre outras técnicas de agitação.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma nova metodologia de análise para inseticidas organofosforados e piretróides em solos, associando a técnica de microextração líquido-líquido dispersiva com solvente menos denso que a água e a técnica de extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura e cromatografia gasosa com detecção por ECD. O trabalho foi desmembrado em duas etapas, sendo a primeira a otimização e validação da técnica LDS/DLLME para análise de agrotóxicos organofosforados e piretróides em água e a segunda etapa sendo a otimização e validação da técnica LDS/DLLME hifenada com a extração sólido líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) para determinação de agrotóxicos organofosforados e piretróides em solo.

CAPÍTULO 1 – OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DLLME PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS ORGANOFOSFORADOS E PIRETRÓIDES EM ÁGUA

1. INTRODUÇÃO

A técnica de extração e pré-concentração mais antiga é a extração líquido-líquido - LLE (LIU & DASGUPTA, 1996) e sua variação para matrizes sólidas, a extração sólido-líquido (SLE). Entretanto, tanto a LLE como a SLE são normalmente demoradas e consomem grandes quantidades de solvente orgânico, além de necessitar de quantidades razoáveis de amostras. Como alternativa, a extração em fase sólida (SPE) apresenta-se mais efetiva em relação às duas citadas, pois utiliza muito menos solvente orgânico e possibilita melhores fatores de enriquecimento (ARTHUR & PAWLISZYN, 1990), porém, pode ser mais onerosa e mais demorada, além de apresentar problemas relacionados à reprodutibilidade dos resultados (ZANG *et al.*, 2009).

Técnicas de microextração foram sendo desenvolvidas e apresentadas desde o início dos anos 90, sempre buscando atender as demandas analíticas, no que tange pré-concentração, reprodutibilidade e detectabilidade, como as questões preconizadas pela química analítica verde (TOBISZEWSKI *et al.*, 2008).

Em 1990, a microextração em fase sólida (SPME), foi apresentada por Arthur e Pawliszyn, sendo uma técnica livre de solvente baseada na capacidade de adsorção de uma pequena fibra de polímero, o que possibilita simultaneamente a extração e pré-concentração do analito da amostra por imersão direta ou por *headspace* (ARTHUR & PAWLISZYN, 1990). Esta técnica é seletiva e tem alto fator de concentração, porém a fragilidade da fibra e seu tempo de vida útil limitado são características que requerem maiores investimentos, além do efeito de memória representar um problema (ZANG *et al.*, 2009 & REZAEI *et al.*, 2010).

A microextração líquido-líquido (LLME) foi proposta em 1996, por Liu e Dasgupta, sendo uma técnica de extração de baixo custo e alto poder de pré-concentração, que miniaturiza a técnica LLE e minimiza o uso de solventes orgânicos, além de reduzir o volume de amostra necessário. Esta técnica se baseia na partição entre uma solução aquosa e um solvente orgânico imiscível em água, utilizando-se microvolumes da amostra e do solvente (LIU & DASGUPTA, 1996). No mesmo ano, Jeannot e Cantwell apresentaram uma técnica similar, porém, o volume

de amostra era bem maior do que o volume de solvente (octan-1-ol, 8 μ L). A microtécnica consistiu em um tubo contendo o volume de solvente orgânico, com apenas uma interface na saída do tubo, no formato de gota, imerso na amostra, sob agitação constante e controlada. A técnica foi chamada de microextração por solvente dentro de uma gota única e seu princípio se baseia na transferência dos analitos da amostra aquosa para o solvente orgânico, por partição, ocorrendo um processo de concentração do analito de interesse, devido às diferenças de volume entre as fases (JEANNOT & CANTWELL, 1996). Em 1997, os mesmos autores apresentaram novo trabalho no qual adaptavam o solvente orgânico diretamente em uma seringa, e diminuíram o volume do solvente ainda mais, agora para 1,0 μ L, integrando o processo de extração com o processo de injeção da amostra no cromatógrafo a gás (GC). O solvente extrator foi exposto à amostra na forma de uma gota única instalada na ponta da agulha de uma seringa, ficando conhecida como SDME – single drop microextração (JEANNOT & CANTWELL, 1997). As vantagens da técnica são o menor uso de solvente, maior concentração dos analitos e integração do processo de extração e injeção. Alguns pontos de fragilidade da técnica são a fragmentação da gota devido à rápida agitação, a possibilidade de formação de bolhas de ar e o longo tempo para se estabelecer o equilíbrio de partição necessário (SHEN & LEE, 2002; AHMADI *et al.*, 2006).

Em 2002, Shen e Lee apresentaram a microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME), que utiliza pequenos volumes de solventes inseridos dentro de uma fibra oca porosa, que pode ser inserida em uma amostra. Os autores relatam que a técnica tem caráter de *clean-up*, pois a fibra porosa tem afinidade com alguns compostos, impedindo outros de penetrarem no sistema extrator (SHEN & LEE, 2002). Assim como a SDME, a HF-LPME proporciona altos fatores de concentração, e baixo uso de solvente, porém impede a fragmentação da gota, o que pode ocorrer da SDME.

Em 2006, Rezaee e colaboradores desenvolveram uma técnica de microextração baseada na utilização de uma mistura ternária, batizada de microextração líquido-líquido dispersiva – DLLME (RAMOS, 2012). A técnica possui alto poder de concentração dos analitos e tem como princípio a utilização de uma mistura de dois solventes orgânicos. Um solvente é o extrator e outro é o solvente dispersor. Os volumes utilizados se situam abaixo de 100 μ L para o extrator e ente

200 e 1500 μL para o dispersor. Essa mistura é injetada rapidamente em uma solução aquosa contendo o analito de interesse através de uma microseringa, formando uma solução turva, devido à fragmentação do solvente orgânico, formando microgotas dispersas na amostra aquosa. Essa solução é agitada e, em seguida, centrifugada para separação das fases. Consecutivamente, a fase orgânica é removida e injetada no instrumento analítico para quantificação, normalmente por cromatografia gasosa (GC) ou por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (REZAEI *et al.*, 2006). No trabalho desenvolvido pelos autores foi utilizado tetracloreto de carbono como solvente extrator (8,0 μL) e acetona como solvente dispersor (1,0 mL). Essa mistura foi aplicada em 5,0 mL de amostras de água para determinação de 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), além de outros compostos orgânicos, e detecção por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (GC/FID). Após a injeção da mistura na amostra, esta foi centrifugada a 6.000 rpm, por 1,5 minutos. Os resultados demonstraram o alto fator de enriquecimento da técnica, variando de 113 a 603, apresentando boa precisão (RSD de 1,4 a 10,6%), baixo limite de detecção (LOD de 0,007 a 0,030 $\mu\text{g L}^{-1}$) e % de recuperação entre 60,3 e 113 %.

A DLLME apresenta uma série de vantagens, entre elas, a simplicidade de operação, rapidez, baixo custo, alto fator de recuperação e enriquecimento e a minimização no uso de solventes orgânicos tóxicos, o que a enquadra nas técnicas analíticas verdes. O tipo de solvente extrator e dispersor pode afetar o processo de extração de forma significativa. Além deles também são fatores críticos os volumes utilizados de cada solvente da mistura extratora e o tempo de extração (REZAEI *et al.*, 2006; ZANG *et al.*, 2009).

O solvente extrator precisa ter a característica de baixa solubilidade em água (KOZANI *et al.*, 2007) e os primeiros trabalhos referentes ao uso da DLLME utilizaram solventes extratores mais densos que a água. Alguns dos solventes usados foram tetracloreto de carbono (REZAEI *et al.*, 2006), clorobenzeno (BERIJANI *et al.*, 2006) e tetracloreto de carbono (XIONG & HU, 2008). Em geral, utiliza-se de 5 a 100 μL de solvente extrator (ZANG *et al.*, 2009).

O solvente dispersor deve ter a característica de ser miscível tanto na fase orgânica extratora, como na fase aquosa, para conseguir introduzir o solvente extrator na amostra, na forma de gotas pequenas (KOZANI *et al.*, 2007) agindo

como um co-solvente. Acetonitrila (C_2H_3N), acetona (C_3H_6O) e metanol (CH_4O) foram os solventes dispersores selecionados para os experimentos no desenvolvimento da técnica (REZAEI *et al.*, 2006). Também podem ser utilizados etanol e tetraidrofurano (WANG *et al.*, 2011). Os volumes usualmente utilizados variam de 0,5 a 1,5 mL do reagente (ZANG *et al.*, 2009).

Na microtécnica DLLME, o tempo de extração é definido como o intervalo de tempo entre a injeção da mistura de solventes extrator e dispersor e a centrifugação (REZAEI *et al.*, 2006). Este fator é um diferencial da técnica DLLME em relação às outras técnicas de microextração. Nas técnicas citadas anteriormente, como microextração em fase sólida (SPME) e microextração em gota única (SDME), a eficiência da extração depende de grandes intervalos de tempo para que se alcance o equilíbrio de partição do analito da fase aquosa para fase orgânica.

Diversos trabalhos utilizando a DLLME como técnica de extração com aplicação em amostras de água foram apresentados nos anos subsequentes, tais como determinação de organofosforados (BERIJANI *et al.*, 2006), que aplicaram a técnica para 5,0 mL de amostra aquosa, 1,0 mL de acetona como solvente dispersor e 12 μ L de clorobenzeno como solvente extrator. Cromatografia gasosa com detector fotométrico de chama (GC/FPD) foi utilizada como instrumento analítico. Outro trabalho apresentado foi a determinação do teor de clorobenzenos (1,2-diclorobenzeno, 1,3-diclorobenzeno, 1,4-diclorobenzeno, 1,2,3-triclorobenzeno, 1,2,4-triclorobenzeno, 1,3,5-triclorobenzeno, 1,2,3,4-tetraclorobenzeno, 1,2,4,5-tetraclorobenzeno, 1,2,3,5-tetraclorobenzeno, pentaclorobenzeno e hexaclorobenzeno) em amostras de água, obtendo valores de limite de detecção abaixo de 50 $ng\ L^{-1}$ para todos os analitos investigados. Usou-se clorobenzeno como solvente extrator (9,5 μ L) e acetona como solvente dispersor (0,5 mL). Altos fatores de enriquecimento foram obtidos assim como no trabalho publicado por Rezaei e colaboradores em 2006 (KOZANI *et al.*, 2007).

Além de amostras de água, outras matrizes foram avaliadas, tais como mel e chá sempre utilizando solventes mais densos que a água (CHEN, *et al.*, 2009; MOINFARA & HOSSEINI, 2009).

Aplicações em matrizes sólidas, como alimentos, foram desenvolvidas a partir de 2007. Zhao e colaboradores descreveram a aplicação da técnica na determinação de seis organofosforados em melancia e pepino por cromatografia

gasosa com detector fotométrico de chama (GC/FPD). Clorobenzeno foi utilizado como extrator (27 μL) e acetonitrila como dispersor (1 mL). A amostra sólida foi submetida a um processo de extração prévia com acetonitrila. Do extrato obtido previamente, diluiu-se 1,0 mL em 5 mL de água, e aplicou-se a mistura extratora clorobenzeno/acetonitrila. A recuperação para os seis analitos ficou na faixa entre 67 e 111 %, os limites de detecção se situaram entre 0,010 e 0,190 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e os fatores de enriquecimento entre 41 e 50 (ZHAO *et al.*, 2007).

Até 2008, os trabalhos realizados com DLLME utilizavam solventes mais densos que a água, normalmente halogenados, e com grau de toxicidade alta. Em 2008, Leong & Huang apresentaram um estudo aplicando a técnica DLLME em água, porém, utilizaram um solvente menos denso que a água. Esses solventes são menos tóxicos e mais comuns que os solventes mais densos que a água, utilizados em trabalhos anteriores, resolvendo um dos pontos críticos da técnica (GUO & LEE, 2011). O estudo apresentado utilizou o dodecan-2-ol como solvente extrator, que por suas características físicas, pode ser solidificado em temperaturas menores que 20 °C, facilitando a separação da fase orgânica da amostra aquosa, o que facilita a coleta. Esta técnica foi denominada de microextração dispersiva líquido-líquido com solidificação da gota orgânica flutuante (DLLME/SFO). O experimento foi realizado a partir da injeção de uma mistura extratora de 0,5 mL de acetona (solvente dispersor) e 10 μL de dodecan-2-ol (solvente extrator) a uma amostra de 5,0 mL de água contendo os analitos de interesse (compostos orgânicos halogenados). Após centrifugação, o tubo contendo a solução foi resfriado em banho de gelo, por 5 minutos, o que fez com que as gotas de dodecan-2-ol que estavam flutuando na superfície do tubo se solidificassem. O extrato solidificado foi coletado, rapidamente fundido à temperatura ambiente e injetado no cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC/MS) ou no cromatógrafo a gás com detector de captura de elétrons (GC/ECD) (LEONG & HUANG, 2008).

Outros exemplos de trabalhos aplicando essa variação de DLLME foram apresentados por Liu e colaboradores (LIU *et al.*, 2010), que analisaram piretróides em água, utilizando dodecan-1-ol como extrator e metanol como solvente dispersor e a determinação de agrotóxicos organofosforados em frutos com pré-extração por ultrassom e posterior DLLME/SFO, onde foram usados undecan-1-ol como solvente extrator e acetona como solvente dispersor (PIRSAHEBA *et al.*, 2013).

Em 2009, Farajzadeh e colaboradores apresentaram a variação da técnica DLLME utilizando solvente de densidade menor que a da água na determinação de organofosforados em água, que foi denominada de LDS/DLLME. Cicloexano Foi utilizado como solvente extrator (100 μL) e acetona como solvente dispersor (2,0 mL). Os LOQs obtidos para os agrotóxicos estudados, por essa técnica associada ao GC/MS foram de 0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$, para uma faixa linear de 0,01 a 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (FARAJZADEH *et al.*, 2009)

Outros solventes menos densos que a água começaram a ser utilizados, na técnica DLLME. Para diferenciação das técnicas original e SFO, passaram a ser identificadas com a adição de diversas siglas adicionais, de acordo com o tipo de processo utilizado na extração. A microextração líquida líquido dispersiva por solvente de terminação (ST/DLLME) é uma técnica DLLME onde utiliza-se solvente menos denso que a água, e utiliza-se volumes adicionais do solvente dispersor para realizar a separação das fases, no lugar da etapa de centrifugação. Essa variação da técnica foi introduzida por Chen e colaboradores, em 2010, onde usaram tolueno como extrator e acetonitrila como agente dispersor e desemulsificador (separador), na determinação de carbamato em água. Os autores utilizaram balões volumétricos como artefatos no processo de extração e a instrumentação analítica utilizada foi cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC/MS) (CHEN *et al.*, 2010). Outro trabalho utilizando a ST/DLLME foi apresentado por Guo e Lee, em 2011, onde, apesar dos autores denominarem a técnica com outra sigla (LDS/SD/DLLME), é semelhante à técnica ST/DLLME de Chen e colaboradores, com a diferença no tipo de artefato utilizado, que foram pipetas de Pasteur de polietileno, ao invés de balões volumétricos de 5 mL. Utilizou-se na extração de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) em água e posterior detecção por GC/MS, hexano como solvente extrator (50 μL) e acetona como solvente dispersor (0,5 mL) e desemulsificador (GUO & LEE, 2011).

Outra variação da técnica DLLME foi apresentada por Leong e colaboradores, em 2010, denominada pelos autores de microextração líquido-líquido dispersiva com solvente de baixa toxicidade (LT/DLLME). Para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em amostra de água, foi utilizado 10 μL de 1-bromo-3-metilbutano como solvente extrator e 50 μL de ácido propiônico como solvente dispersor (LEONG *et al.*, 2010).

O uso de solventes mais leves que a água na técnica DLLME tem se consolidado como uma variação da técnica DLLME sendo aplicada na determinação de vários grupos de analitos, bem como em vários tipos de matrizes, tais como triazóis em amostras de água, warfarina em plasma humano, aminas biogênicas em cerveja, antioxidantes em suco de frutas e cipermetrina em tecidos e sangue de ratos (FARAJZADEH *et al.*, 2012; GHAMBARI & HADJMOHAMMADI, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2012; BIPARVA *et al.*, 2012; MUDIAM *et al.*, 2012).

Apesar da técnica DLLME ser bem conhecida, a sua variação LDS/DLLME ainda está em processo de desenvolvimento. Poucos são os trabalhos publicados envolvendo a determinação de várias classes de agrotóxicos simultaneamente, numa mesma matriz. Dessa forma, torna-se necessário o estudo da técnica, buscando a otimização dos fatores mais críticos na extração de agrotóxicos em água, no sentido de realizar um estudo de duas classes em conjunto. Outra importância desta etapa do trabalho é que a otimização da técnica LDS/DLLME em água servirá para a etapa de aplicação da técnica hifenada em amostras de solo.

Este capítulo apresenta um estudo de aplicação de LDS/DLLME para determinação de organofosforados e piretróides em amostras de água, visando posterior aplicação em amostras de solo.

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais

- Desenvolver um método de microextração líquido-líquido dispersiva com solvente menos denso que a água (LDS/DLLME), para a extração e análise de organofosforados e piretróides em águas por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (GC/ECD).

Objetivos específicos

- Desenvolver e otimizar a técnica de extração LDS/DLLME para os analitos em amostras de água, avaliando-se fatores tais como, solvente extrator, solvente dispersor, composição da fase extratora, tipo de agitação e tempo de agitação.
- Validar o método desenvolvido com relação aos parâmetros: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão intermediária e exatidão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e soluções

Os solventes e padrões utilizados foram:

- tolueno, 99% (Merck, Rio de Janeiro),
- Ciclohexano 99% (Sinth, São Paulo)
- Octan-1-ol P.A (VETEC, Rio de Janeiro)
- Hexano P.A (VETEC, Rio de Janeiro)
- acetonitrila, 99,5% - grau HPLC (Sigma-Aldrich,USA),
- permetrina, 92,4% m/m, (Sygenta, Brasil)
- cipermetrina, 92,4% m/m, (Sygenta, Brasil)
- clorpirifós, 99,0% m/m, (Sygenta, Brasil)
- λ -cialotrina, 86,5% m/m, (Sygenta, Brasil)
- deltametrina, 99% m/m (Sygenta, Brasil)
- parationa-metílica, 99% m/m, (Sygenta, Brasil).
- profenofós, 92% m/m (Dr. Erchenstoffer, Germany)
- bifentrina-92,2% m/m (FMC, Brasil).

Foram preparadas soluções-estoque dos padrões de agrotóxicos, na concentração de 1000,0 mg L⁻¹, em acetonitrila e, a partir destas, soluções-trabalho na concentração de 10,0 mg L⁻¹, em acetonitrila. As diluições necessárias foram realizadas a partir das soluções de trabalho e todas foram armazenadas à temperatura de aproximadamente -20 °C, em freezer vertical (Continental-Brasil). Na etapa de validação foram utilizadas soluções preparadas com água tipo 1 (sistema Milli-Q).

3.2 Equipamentos e materiais

Foram utilizados os seguintes equipamentos nesta etapa:

- Agitador vortex modelo CERTOMAT® MV (B. BRAUN INTERNACIONAL, Melsugen, Alemanha);
- Centrífuga modelo 222-T28 (QUIMIS, Rio de Janeiro, Brasil);
- Balança analítica modelo BP221 S (SARTORIUS, Göttingen, Alemanha);
- Freezer 280 L (CONSUL, Minas Gerais, Brasil);

- Cromatógrafo a gás modelo GC 17-A (SHIMADZU, Kioto, Japão) equipado com um detector por captura de elétrons (GC/ECD) e injetor split/splitless, coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm x 0,10 µm de espessura de filme), da Phenomenex (USA), modelo ZB-5 (apolar, 5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano)

- As condições cromatográficas foram:

* Programação de temperatura:

150 °C (1 min) $\xrightarrow{30\text{ °C min}^{-1}}$ 210 °C (1 min) $\xrightarrow{30\text{ °C min}^{-1}}$ 250 °C (2 min) $\xrightarrow{20\text{ °C min}^{-1}}$ 290 °C (5 min)

- A corrida cromatográfica durou 14,3 minutos.

- O detector por captura de elétrons (ECD) foi mantido a 300 °C e o injetor split/splitless foi mantido a 280 °C.

- Nitrogênio 99,999% puro foi usado como gás de arraste, a uma vazão de 1,2 mL min⁻¹ e o gás de *make-up* foi mantido em 55 kPa.

- O volume injetado foi de 1,0 µL, a uma razão de Split de 1:5.

3.3 Agrotóxicos utilizados

Os agrotóxicos utilizados no presente estudo são inseticidas das classes dos organofosforados e dos piretróides. Encontram-se na Tabela 1 com algumas características físico-químicas.

Tabela 1 – Agrotóxicos utilizados na otimização e validação da técnica LDS/DLLME.

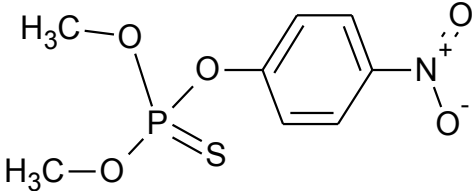
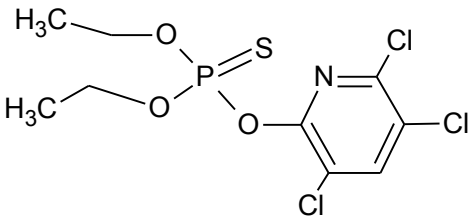
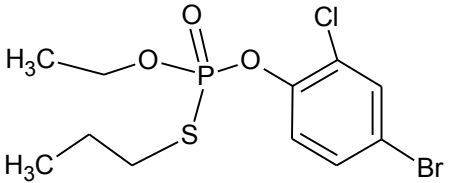
Agrotóxicos	Estrutura Química	Grupo Químico	Massa Molecular (g mol ⁻¹) ^b	Temperatura de Ebulição (°C) ^a	K _{ow} (pH 7,0 / 20 °C) ^b
Parationa-metílica		Organofosforado	263,21	334,7	1,00x10 ³
Clorpirifós		Organofosforado	350,89	375,9	5,01x10 ⁴
Profenofós		Organofosforado	373,63	401,8	5,01x10 ¹

Tabela 1 – Agrotóxicos utilizados na otimização e validação da técnica LDS/DLLME.

(continuação)

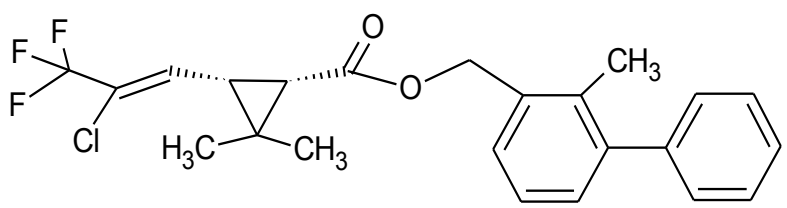
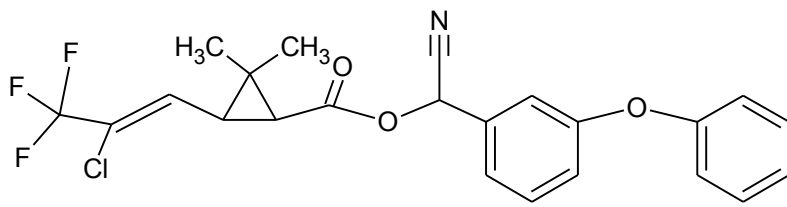
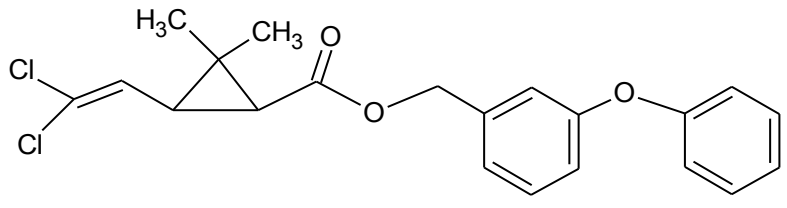
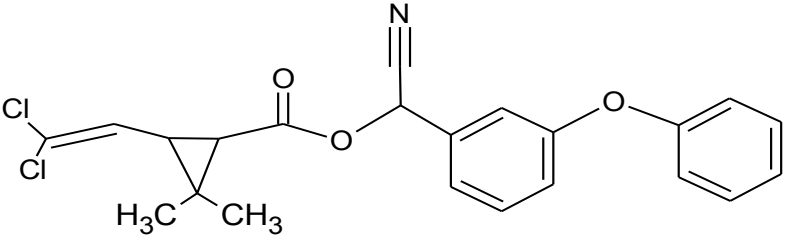
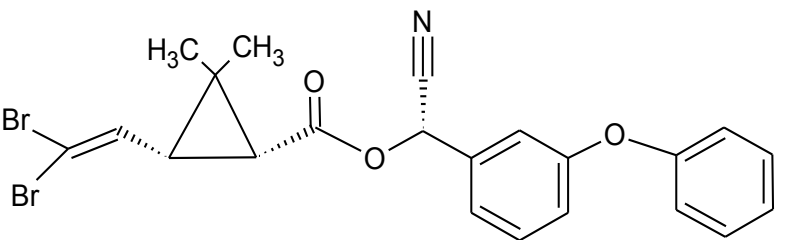
Agrotóxicos	Estrutura Química	Grupo Químico	Massa Molecular (g mol ⁻¹) ^b	Temperatura de Ebulição (°C) ^a	Kow (pH 7,0 / 20 °C) ^b
Bifentrina		Piretróides	422,88	453,2	3,98x10 ⁶
λ-Cialotrina		Piretróides	449,85	498,9	7,94x10 ⁶
Permetrina		Piretróides	391,3	465,9	1,26x10 ⁶

Tabela 1 – Agrotóxicos utilizados na otimização e validação da técnica LDS/DLLME.

(continuação)

Agrotóxicos	Estrutura Química	Grupo Químico	Massa Molecular (g mol ⁻¹) ^b	Temperatura de Ebulição (°C) ^a	Kow (pH 7,0 / 20 °C) ^b
Cipermetrina		Piretróides	416,3	511,3	2,00x10 ⁵
Deltametrina		Piretróides	505,2	535,8	3,98x10 ⁴

^a - <http://www.chemspider.com>; (Previsto por ACD/Labs (760 mmHg));^b - <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/>;

3.4 Microextração Líquido-Líquido Dispersiva com solvente de baixa densidade (LDS/DLLME)

3.4.1 Preparo e fortificação das amostras de água

As amostras de água pura foram preparadas a partir da diluição da solução de trabalho (10 mg L^{-1}) contendo os agrotóxicos de interesse, em balões de 25 mL, usando-se água do sistema Milli-Q como solvente, para cada concentração desejada. Alíquotas de 5,00 mL de cada solução aquosa preparada, nas concentrações desejadas, foram adicionadas em tubos de ensaio de 10,0 mL de capacidade, homogeneizadas em agitador vórtex, por 30 segundos e deixadas em repouso por aproximadamente 1 hora. Posteriormente, estas amostras foram submetidas ao procedimento de extração dos oito agrotóxicos.

3.4.2 Condições otimizadas da técnica de extração LDS/DLLME para os agrotóxicos em água

Para amostras de 5,0 mL volume, injetou-se rapidamente na amostra uma mistura de 80 μL de tolueno (solvente extrator) e 400 μL de acetonitrila (solvente dispersor), com o auxílio de uma micropipeta de 1000 μL (HTE, Polônia). Após a injeção da mistura, agitou-se a amostra por 60 segundos em um aparelho vortex, para garantir a total mistura da solução. Centrifugou-se o tubo com a mistura por 5 minutos em 3200 rpm (2290 g) para separação das fases e retirou-se 50 μL da fase orgânica formada na superfície da solução aquosa. Armazenou-se a fase orgânica recuperada em um frasco de vidro de 2,0 mL (vial), com insert redutor de volume (150 μL). Retirou-se uma alíquota de 1,0 μL dessa solução e injetou-se no GC/ECD.

3.5 Otimização do Método de Extração LDS/DLLME

Na otimização do método avaliou-se o efeito de fatores que poderiam influenciar no processo de extração: tipo e volume do solvente extrator, tipo de volume do solvente dispersor, modo e tempo de agitação da amostra. As condições iniciais do processo de otimização da técnica de extração encontram-se na Tabela 2. A maior resposta cromatográfica, isto é, a maior área obtida para os picos referentes ao analito de interesse, assim como o menor coeficiente de variação ou conveniências experimentais foram critérios utilizados para escolha da condição ótima de extração.

Tabela 2 - Condições iniciais do processo de extração LDS/DLLME

FATORES	QUANTIDADES
Volume de amostra	5 mL
Volume de Solvente Dispersor	800 μL
Volume de Solvente Extrator	80 μL
Concentração da amostra	1 $\mu\text{g L}^{-1}$
Volume injetado	1 μL

3.5.1 Efeito do solvente extrator

Foram testados quatro solventes como solvente extrator: hexano, ciclohexano, tolueno e octan-1-ol, que possuem densidade menor que a da água. A Tabela 3 apresenta algumas propriedades físico-químicas dos solventes testados.

Tabela 3 - Propriedades físico-químicas dos solventes extratores testados

Solvente	Massa Molar (g mol^{-1})	Densidade (g cm^{-3} a 25 °C)	Ponto de Ebulição (°C)
Hexano	86,18	0,659	69
Ciclohexano	84,16	0,745	81
Octan-1-ol	130,23	0,826	195
Tolueno	92,14	0,867	111

3.5.2 Efeito do tipo de agitação

O efeito do tipo de agitação foi testado nas formas de agitação manual e agitação mecânica por vortex. O tempo de agitação foi fixado em 30 segundos para todas as duas formas de agitação. A velocidade de agitação foi mantida em 8, no vortex usado, para as duas formas de agitação. O solvente extrator utilizado foi o solvente definido no item 3.5.1 e o solvente dispersor foi acetonitrila, sendo utilizados os volumes definidos na Tabela 2.

3.5.3 Efeito do tipo de solvente dispersor

Foram testados 4 (quatro) solventes orgânicos nesta etapa, utilizando-se o volume estabelecido na Tabela 2. São eles acetonitrila, acetona, metanol e etanol.

3.5.4 Efeito do tempo de agitação e efeito da velocidade de agitação

Os fatores efeito do tempo de agitação e efeito da velocidade de agitação, na extração LDS/DLLME foram avaliados através de um planejamento fatorial 2^2 com ponto central que constam na Tabela 4. Os ensaios foram realizados em duplicata.

TABELA 4 - Planejamento fatorial 2^2 com duplicata no ponto central para os fatores tempo de agitação e velocidade de agitação no vortex

ENSAIOS	FATORES ORIGINAIS		FATORES CODIFICADOS	
	Tempo de Agitação (t)	Velocidade Vortex (v)	Tempo de Agitação (t)	Velocidade Vortex (v)
1	15 s	6	-	-
2	60 s	6	+	-
3	15 s	8	-	+
4	60 s	8	+	+
5	30 s	7	0	0

3.5.5 Efeito dos volumes do solvente extrator e solvente dispersor

Para a avaliação do efeito dos volumes do solvente extrator e solvente dispersor foi utilizado um planejamento fatorial 2^2 com ponto central em triplicata. Foram utilizados volumes do solvente extrator de 40 μL e 80 μL e do solvente dispersor de 400 μL e 800 μL (Tabela 5). O tempo e a velocidade de agitação utilizados foram os determinados no item 3.5.4.

Tabela 5 - Planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central para os fatores volume do solvente extrator e volume do solvente dispersor

ENSAIOS	FATORES ORIGINAIS		FATORES CODIFICADOS	
	Volume solvente extrator	Volume solvente Dispersor	Volume solvente extrator	Volume solvente dispersor
6	40 μL	400 μL	-	-
7	80 μL	400 μL	+	-
8	40 μL	800 μL	-	+
9	80 μL	800 μL	+	+
10	60 μL	600 μL	0	0

3.6 Validação da técnica de extração LDS/DLLME

No processo de validação do método otimizado foram avaliadas as figuras de mérito: seletividade, linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão e exatidão. O processo de validação (RIBANI *et al.*, 2004) foi realizado buscando atender aos critérios recomendados pelos principais órgãos regulamentadores, tais quais a ANVISA (ANVISA, 2003), INMETRO (INMETRO, 2007) e pelo Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica (MAPA, 2011).

3.6.1 Seletividade

A seletividade do método analítico foi avaliada comparando-se cromatogramas dos extratos da matriz isenta dos agrotóxicos (extrato em branco), com cromatogramas dos extratos da matriz fortificados com os agrotóxicos de interesse.

3.6.2. Limite de detecção e limite de quantificação do método

O limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) dos agrotóxicos avaliados neste trabalho foram calculados com base nos parâmetros das curvas analíticas de cada analito. O LOD e LOQ foram calculados através das equações (1) e (2).

$$\text{LOD} = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{s}{S} \quad (2)$$

Onde “s” é a estimativa do desvio padrão do branco da equação do modelo de regressão e “S” representa a inclinação da curva analítica. As curvas analíticas tiveram no mínimo 5 níveis de concentrações diferentes, em triplicata.

3.6.3. Linearidade do método

A linearidade do método foi determinada pela injeção de extratos de amostras fortificadas em 6 concentrações crescentes, submetidas à técnica de extração otimizada. Os pontos iniciais das curvas analíticas foram coincidentes com os valores de LOQ de cada agrotóxico. A qualidade do ajuste do modelo de regressão foi avaliada pelo coeficiente de correlação e pela análise do gráfico de resíduos.

3.6.4. Exatidão

Para a avaliação da exatidão do método LDS/DLLME proposto foram realizados ensaios de recuperação. Nestes ensaios, as amostras de água foram fortificadas em concentrações equivalentes a 2,5LQ, 5LQ e 7,5LQ (25%, 50% e 75% da faixa linear), para cada agrotóxico, e submetidas ao procedimento de extração. A exatidão foi avaliada em triplicata. A recuperação foi avaliada em 3 dias não-consecutivos.

3.6.5. Precisão

A precisão do método foi avaliada pelo estudo da repetitividade e da precisão intermediária. O procedimento realizado é o mesmo para a avaliação da exatidão, porém, avalia-se os coeficientes de variação da média das triplicatas ao invés da recuperação.

3.6.5.1. Repetitividade e Precisão intermediária

A repetitividade foi avaliada pelo preparo, injeção e análise, no mesmo dia, de 3 extratos de amostras de água fortificadas com os oito agrotóxicos, em três níveis de concentração diferentes, conforme descrito para o processo de verificação da exatidão e submetidos à técnica de extração otimizada. O parâmetro avaliado é o coeficiente de variação das médias das réplicas em um único dia, enquanto a precisão intermediária avaliou os resultados em 3 dias não-consecutivos .

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Otimização do Método de Extração LDS/DLLME

No processo de otimização da técnica LDS/DLLME estabeleceu-se condições iniciais conforme Tabela 2 e a partir destas condições iniciais, verificou-se a influência de cada parâmetro como descrito no item 3.5.

Alguns fatores foram avaliados de forma univariada, enquanto outros, devido às características e prováveis interações, foram avaliados de forma multivariada, através de planejamentos fatoriais. O solvente extrator, o modo de agitação e o solvente dispersor foram avaliados de forma univariada e os fatores tempo e velocidade de agitação bem como os fatores volumes dos solventes extrator e dispersor foram avaliados através de planejamento fatorial.

As condições cromatográficas foram avaliadas previamente, com os agrotóxicos em solvente puro e se encontram no item 3.2.

A Figura 1 mostra um cromatograma em tolueno contendo os agrotóxicos avaliados.

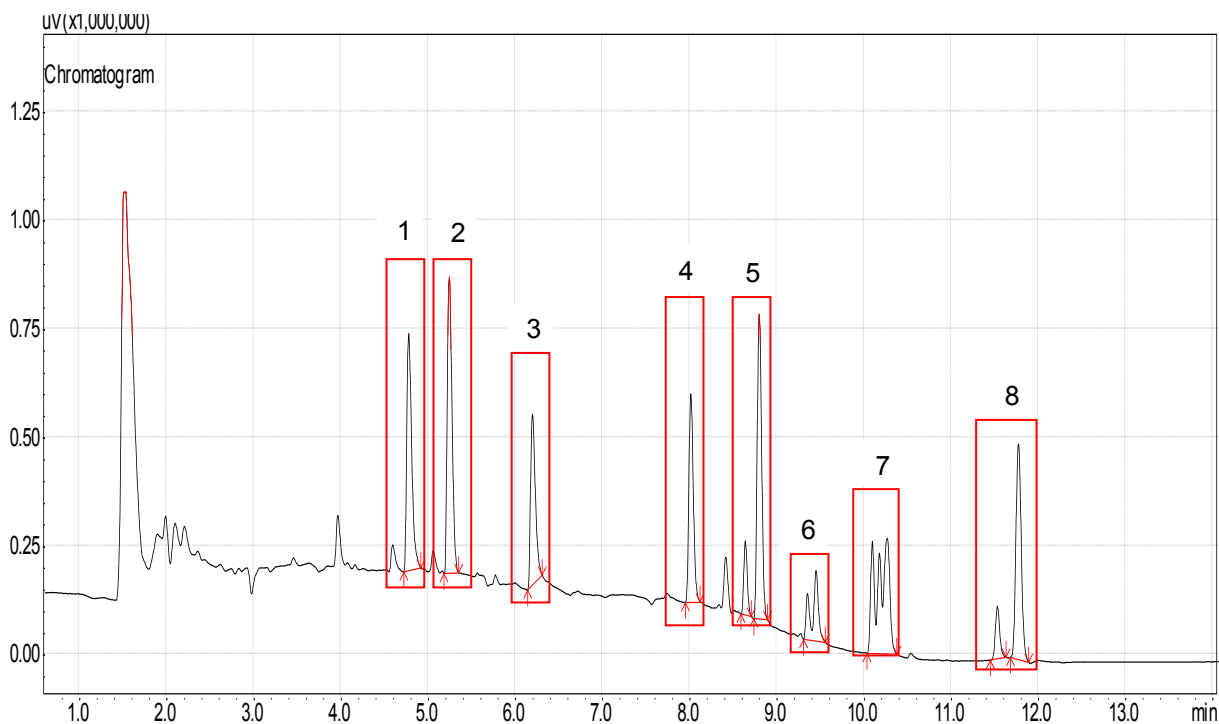


Figura 1: Cromatograma obtido pela injeção de padrões de agrotóxicos preparados em solvente tolueno, na concentração de $250 \mu\text{g L}^{-1}$.

1-Parationa-metilica; 2-Clorpirifós; 3-Profenofós; 4-Bifentrina; 5-Cialotrina; 6-Permetrina; 7-Cipermetrina; 8-Deltametrina.

A Tabela 6 contém os agrotóxicos avaliados com seus tempos de retenção (t_R) após a otimização das condições cromatográficas. Os quatro primeiros agrotóxicos (parationa-metílica, clorpirifós, profenofós e bifentrina) possuem um pico definido para cada um (um único t_R), enquanto os quatro últimos agrotóxicos eluídos no sistema (lambda-cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina) possuem pelo menos dois picos cada (dois t_R). Esses picos correspondem aos isômeros desses agrotóxicos, que possuem átomos de carbono assimétricos em suas moléculas (MASTOVSKA & LEHOTAY, 2004). A quantificação das áreas dos picos obedeceu o critério de integração de cada pico individualmente, com exceção dos agrotóxicos permetrina (6) e cipermetrina (7), que sempre que possível, foram integrados de forma a produzirem apenas um tempo de retenção, apesar de possuírem picos múltiplos.

Nesse estudo, nas condições cromatográficas e com tipo de coluna utilizado, os organofosforados eluem em tempo de retenção menor que os piretróides (Tabela 6).

Tabela 6 - Tempos de retenção dos agrotóxicos nas condições cromatográficas otimizadas.

Ordem de eluição	AGROTÓXICOS	t_{R1} (min)	t_{R2} (min)	Massa Molar (g mol ⁻¹)
1	Parationa-metílica ¹	4,81	-	263,21
2	Clorpirifós ¹	5,22	-	350,89
3	Profenofós ¹	6,22	-	373,63
4	Bifentrina ²	8,05	-	422,88
5	λ -Cialotrina ²	8,67	8,83	449,85
6	Permetrina ²	9,31	9,39	391,3
7	Cipermetrina ²	10,14	-	416,3
8	Deltametrina ²	11,59	11,83	505,2

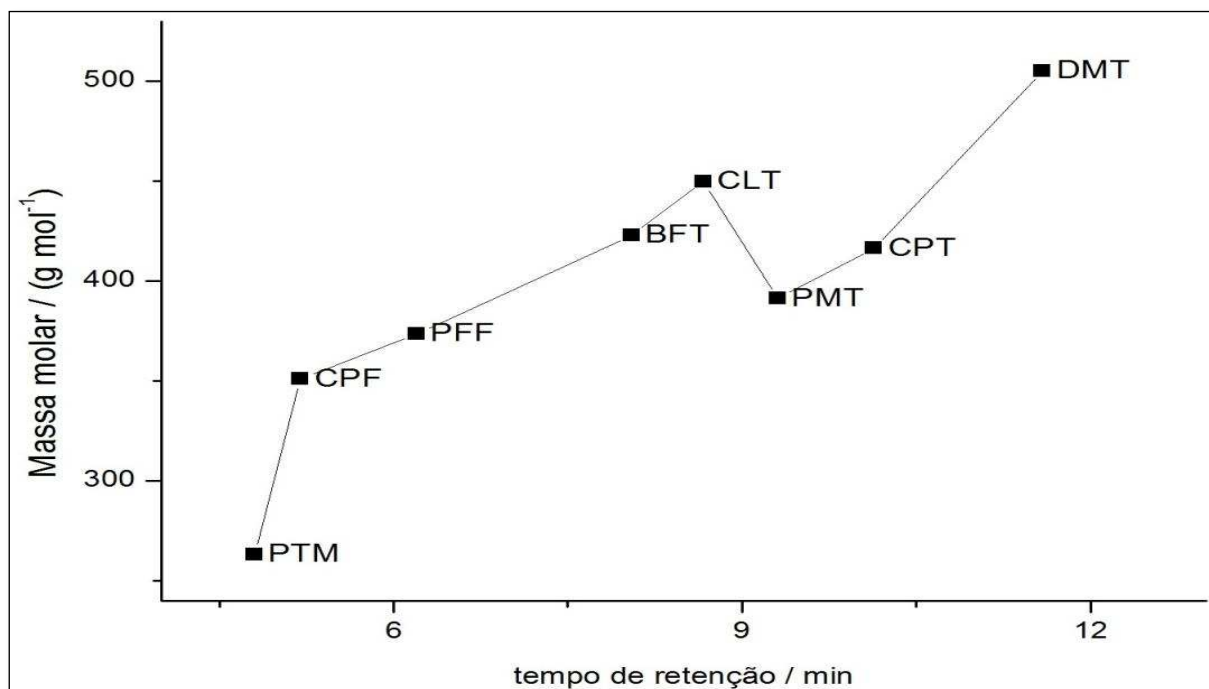
1 – Organofosforados; 2 – Piretróides;

t_{R1} : tempo de retenção do pico 1; t_{R2} : tempo de retenção do pico 2.

A ordem de eluição de substâncias, em um sistema cromatográfico depende das interações não destrutivas entre os analitos e a coluna e, a força da interação analito-coluna depende da polaridade destes. Analitos polares tenderão a se ligar mais fortemente à colunas polares, enquanto analitos apolares, se ligarão mais fortemente à colunas apolares. Dessa forma, em cromatografia de partição, analitos

apolares tenderão a eluir de acordo com o aumento de suas temperaturas de ebulição, conforme as regras de Trouton (BLUMBERG, 2010). Por sua vez, analitos de alta massa molecular necessitarão de altas temperaturas para eluir, evitando assim altos tempos de retenção (ROOD, 2007).

A Figura 2 mostra a relação entre a massa molar e o tempo de retenção dos analitos analisados.



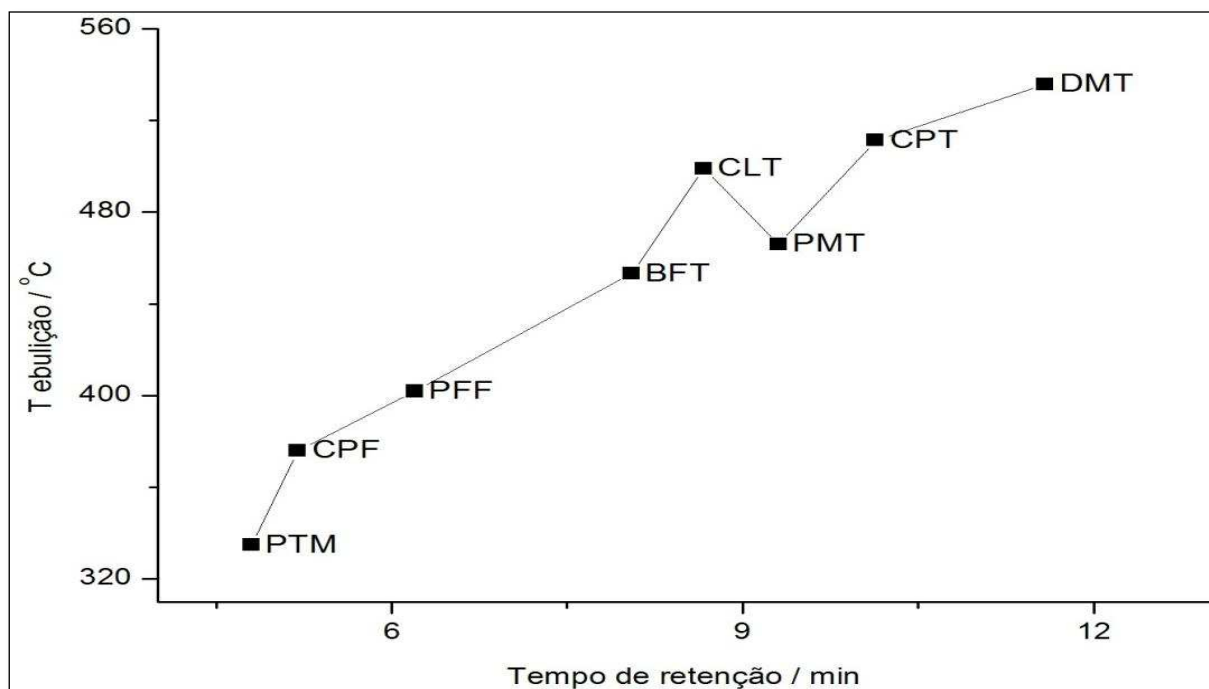
PTM: parationa-metílica; CPF: clorpirifós; PFF: profenofós; BFT: bifentrina; CLT: λ-cialotrina; PMT: permetrina; CPT: cipermetrina; DMT: deltametrina.

Figura 2: Gráfico comparativo entre a massa molar e o tempo de retenção dos agrotóxicos avaliados, conforme dados da Tabela 1

Pode-se observar que, entre a parationa-metílica e a lambda-cialotrina, ocorre um aumento gradativo no tempo de retenção, conforme a massa molar aumenta. A permetrina apresenta o valor de massa molar menor do que a da bifentrina e da lamda-cialotrina, porém o seu tempo de retenção é maior do que esse dois agrotóxicos. A cipermetrina possui massa molar menor do que a lambda-cialotrina, mas possui tempo de retenção maior que esta. A deltametrina apresenta tempo de retenção condizente com sua massa molar, em relação aos demais agrotóxicos.

A Figura 3 mostra o comportamento crescente da temperatura de ebulição frente ao tempo de retenção de cada agrotóxico. Os agrotóxicos possuem um comportamento esperado, com aumento linear no tempo de retenção até a lambda-cialotrina. A permetrina provoca uma inflexão no gráfico, onde sua temperatura de ebulição é menor do que a da lambda-cialotrina, Isso ocorre provavelmente, devido

a permetrina não possuir um radical CN em sua estrutura, o que poderia provocar uma diminuição na sua polaridade e consequente maior tempo de retenção, apesar de sua massa molar e temperatura de ebulição serem menores que a da lambda-cialotrina. A cipermetrina e deltametrina apresentam a tendência de aumento da temperatura de ebulição quando comparada com o tempo de retenção

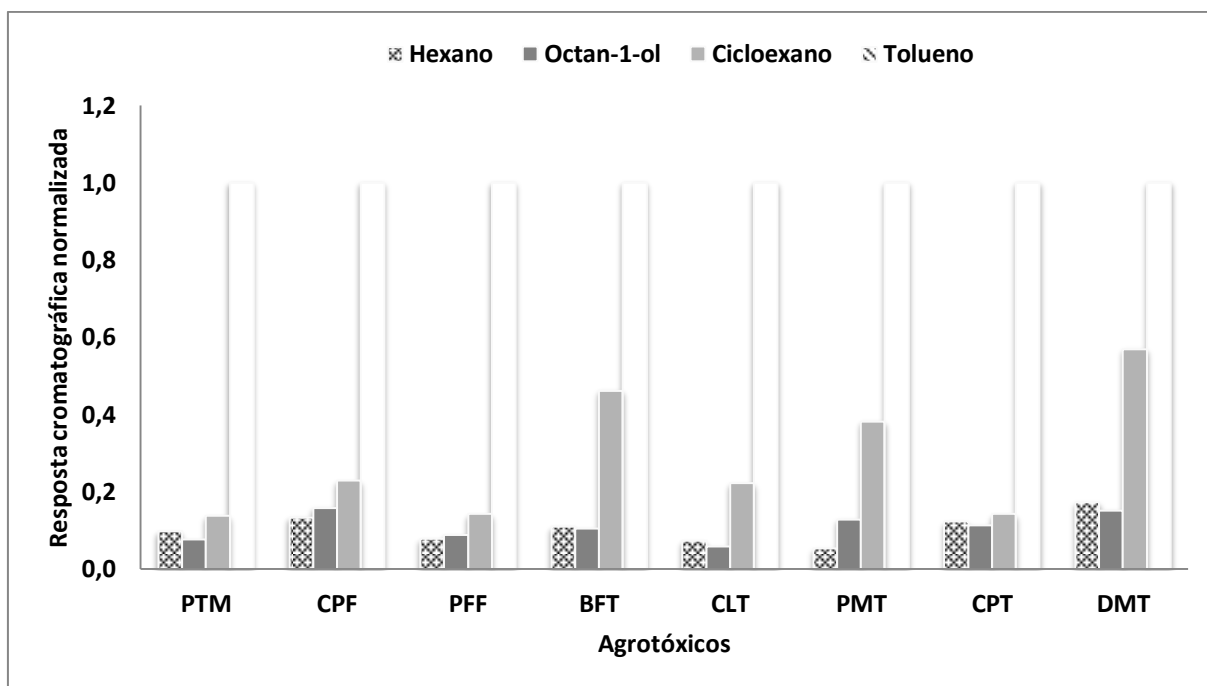


PTM: parationa-metlica; CPF: clorpirifós; PFF: profenofós; BFT: bifentrina; CLT: λ -cialotrina; PMT: permetrina; CPT: cipermetrina; DMT: deltametrina.

Figura 3: Gráfico comparativo entre a massa molar e o tempo de retenção dos agrotóxicos avaliados, conforme dados da Tabela 6.

4.1.1 Efeito do solvente extrator

Para verificar qual solvente seria o mais adequado para utilização na técnica LDS/DLLME, foram escolhidos e testados 4 (quatro) solventes com densidade menor do que a água, sendo eles hexano, ciclohexano, octanol e tolueno. Aplicou-se o processo de extração LDS/DLLME em amostras fortificadas com os agrotóxicos de interesse na concentração de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, para cada solvente escolhido, usando-se acetonitrila como solvente dispersor, mantendo-se as demais condições definidas na Tabela 2 e injetou-se $1,0 \mu\text{L}$ do extrato obtido no GC/ECD. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.



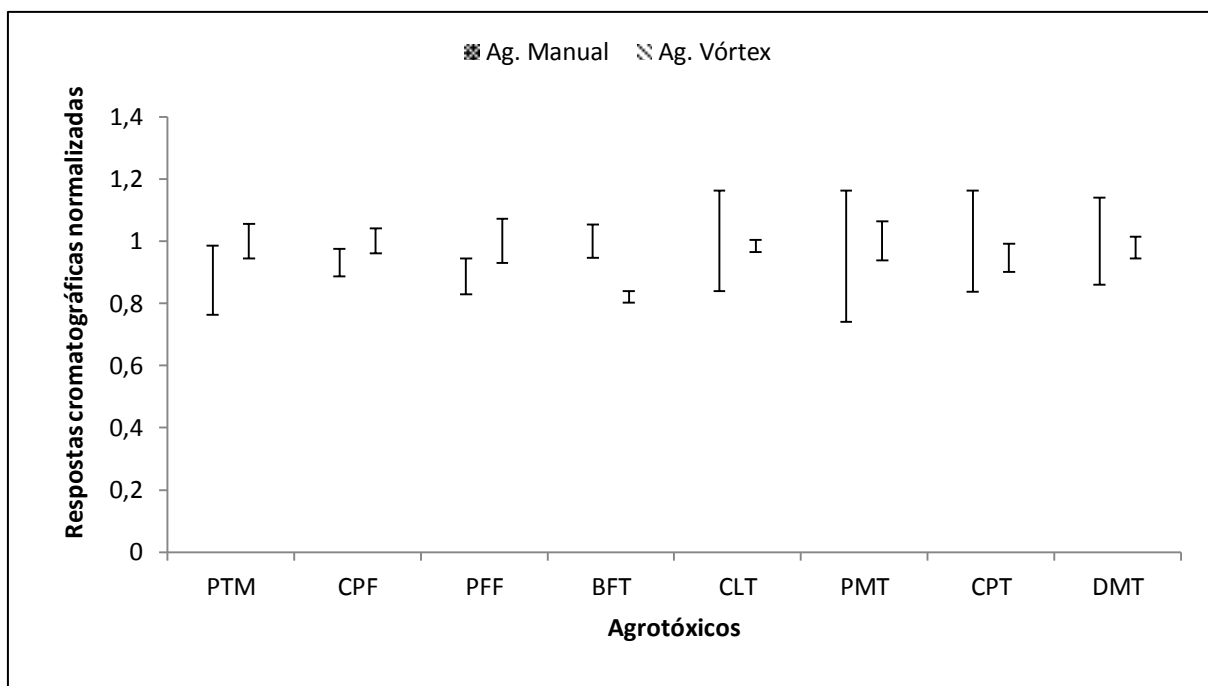
PTM: parationa-metilica; CPF: clorpirifós; PFF: profenofós; BFT: bifentrina; CLT: λ-cialotrina; PMT: permetrina; CPT: cipermetrina; DMT: deltametrina.

Figura 4: Respostas cromatográficas dos analitos para extratos obtidos pela técnica LDS/DLLME nos ensaios com solventes extratores diferentes.

As melhores respostas cromatográficas foram obtidas quando se realizou a extração com tolueno, sendo este o solvente extrator escolhido para ser utilizado no desenvolvimento do método, sendo o mesmo solvente escolhido por Chen e colaboradores, para extração de carbamatos em água, em 2010 (CHEN *et al.*, 2010). Os autores citam a possibilidade de uma maior afinidade entre o tolueno e os agrotóxicos estudados, devido à existência de anéis benzênicos em ambas estruturas, o que se aplica neste estudo também.

4.1.2 Efeito do tipo de agitação

Para verificar o efeito de cada forma de agitação no processo de extração da técnica LDS/DLLME, fixou-se um tempo de agitação e aplicou-se as duas formas de agitação. O tempo escolhido foi de 30 segundos. Para cada forma de agitação aplicou-se o processo de extração LDS/DLLME em amostras fortificadas com os agrotóxicos de interesse na concentração de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando-se tolueno como solvente extrator (escolhido no item 4.1.1) e acetonitrila como solvente dispersor, mantendo-se as condições definidas na Tabela 2 e injetou-se $1,0 \mu\text{L}$ do extrato obtido no GC/ECD. Os resultados para os efeitos nas respostas cromatográficas dos analitos nos dois modos de agitação estão apresentados na Figura 5.



PTM: parationa-metilica; CPF: clorpirifós; PFF: profenofós; BFT: bifentrina; CLT: λ -cialotrina; PMT: permetrina; CPT: cipermetrina; DMT: deltametrina.

Figura 5: Respostas cromatográficas dos analitos para extratos obtidos pela técnica LDS/DLLME nos ensaios com agitação manual e agitação por vortex.

As duas formas de agitação apresentaram respostas cromatográficas semelhantes. A forma de agitação no vortex forneceu valores de coeficiente e variação menores do que a agitação manual, como se observa na Tabela 7, exceto para o agrotóxico profenofós.

Tabela 7 - Coeficientes de variação das respostas cromatográficas obtidas no processo de extração LDS/DLLEM dos analitos por agitação manual e agitação vortex

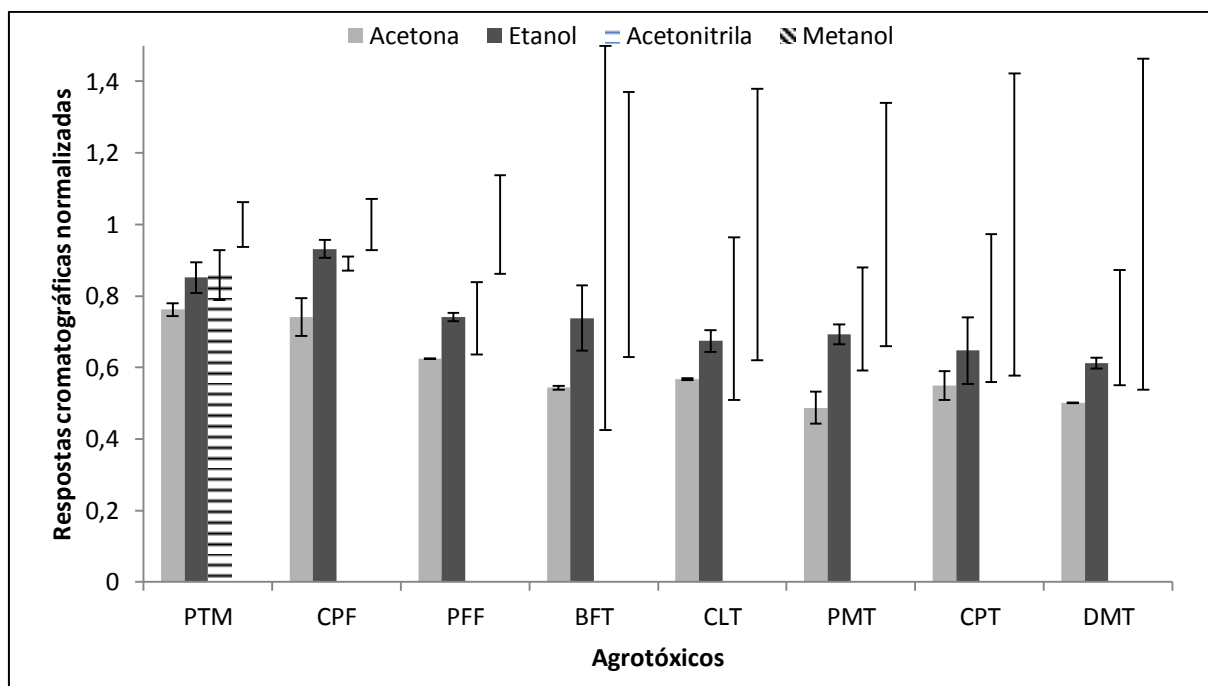
Agrotóxicos	Agitação mecânica (% CV)	Agitação vortex (%CV)
Parationa-metilica	9,8	4,3
Clorpirifós	3,5	3,0
Profenofós	4,9	5,5
Bifentrina	10,2	1,6
λ -Cialotrina	12,4	1,4
Permetrina	16,9	4,8
Cipermetrina	11,0	3,5
Deltametrina	10,4	2,7

Como o processo de agitação da amostra na técnica LDS/DLLME tem como objetivo promover o contato entre o solvente extrator e a amostra, um contato mais eficiente permitirá atingir o equilíbrio mais rapidamente, proporcionando uma extração mais

eficiente e um tempo de extração menor, ambos fatores apresentaram respostas similares. Entretanto, o uso do vortex foi escolhido por apresentar menores coeficientes de variação, melhorando a precisão do método. Dessa forma, escolheu-se a agitação em vortex como forma de agitação a ser utilizada na etapa de extração. Cabe ressaltar que poucos trabalhos publicados têm utilizado vortex como forma de agitação (WANG *et al*, 2011).

4.1.3 Efeito do solvente dispersor

Para verificar o efeito do solvente dispersor, testou-se 4 (quatro) solventes orgânicos que são miscíveis em água. Foram eles: acetonitrila, acetona, metanol e etanol. Para cada solvente dispersor aplicou-se o processo de extração LDS/DLLME em amostras fortificadas com os agrotóxicos de interesse na concentração de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando-se tolueno como solvente extrator ($80 \mu\text{L}$) (definido no item 4.1.1) e agitação por 30 segundos em vortex e volume de solvente dispersor de $800 \mu\text{L}$, mantendo-se as demais condições definidas na Tabela 2 e injetou-se $1,0 \mu\text{L}$ do extrato obtido no GC/ECD. As melhores respostas cromatográficas (Figura 6) foram obtidas quando se usou o solvente dispersor metanol, seguido da acetonitrila, etanol e acetona. A fase orgânica obtida quando se usou acetona como solvente dispersor desenvolveu uma turvação, que não foi observada nas fases orgânicas obtidas quando se utilizou os demais solventes. Os volumes das fases orgânicas obtidas quando se utilizou acetona e metanol foram menores do que os volumes das fases orgânicas obtidas quando se utilizou acetonitrila e etanol. Apesar das melhores respostas cromatográficas terem sido obtidas quando se utilizou metanol, optou-se por utilizar acetonitrila como solvente dispersor, pois a mesma é utilizada como solvente-base da fase orgânica na técnica de extração SLE/LTP, facilitando o processo de hifenação das técnicas, para determinação de resíduos de agrotóxicos em solos, além do metanol ter produzido respostas para os piretróides com desvio padrão bem maior do que a acetonitrila.

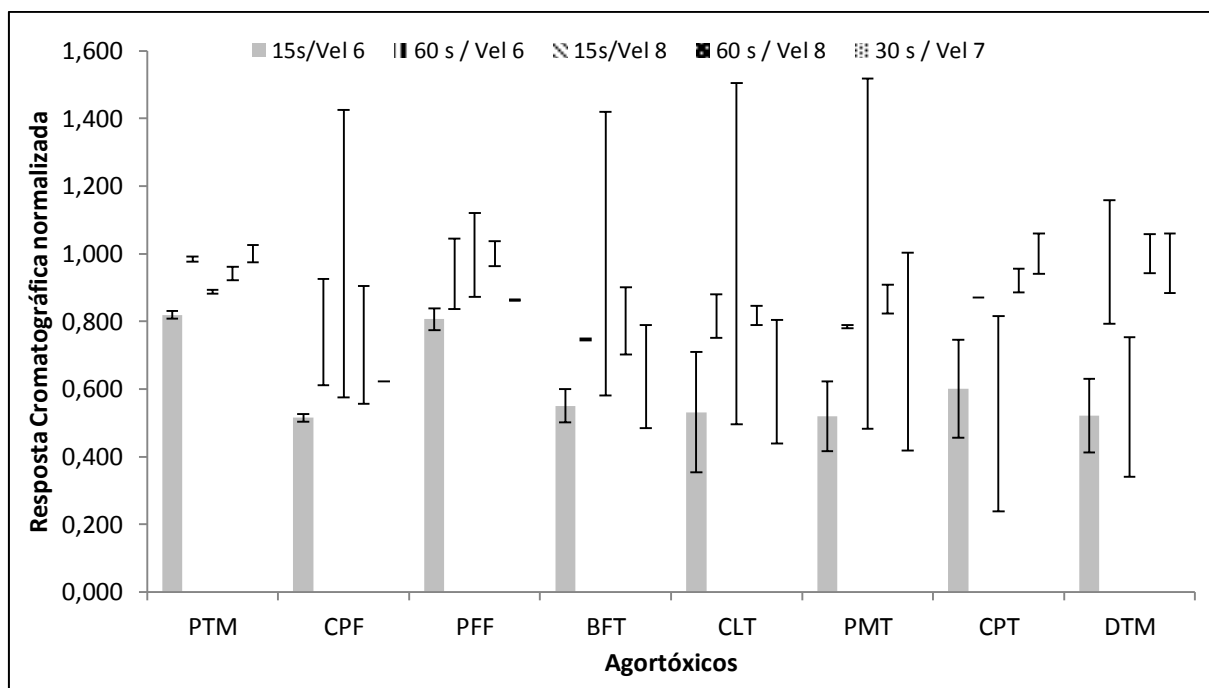


PTM: parationa-metilica; CPF: clorpirifós; PFF: profenofós; BFT: bifentrina; CLT: λ -cialotrina; PMT: permetrina; CPT: cipermetrina; DMT: deltametrina.

Figura 6: Respostas cromatográficas dos analitos em extratos obtidos pela técnica LDS/DLLME nos ensaios com solventes dispersores variados.

4.1.4 Efeito do tempo de agitação e efeito da velocidade de agitação

Na otimização da LDS/DLLME foram também avaliadas as variáveis tempo de agitação e velocidade de agitação. Assim como ocorre com o tipo de agitação, essas variáveis também têm efeitos na cinética de transferência dos analitos para o solvente extrator, de maneira que foram avaliadas simultaneamente essas variáveis através de um planejamento fatorial 2^2 com ponto central. Os tempos de agitação definidos foram de 15 segundos e 60 segundos. As velocidades de agitação foram aquelas obtidas nas velocidades 6 e 8 do agitador vortex utilizado. Para cada ensaio combinado de tempo e velocidade de agitação aplicou-se o processo de extração LDS/DLLME em amostras fortificadas com os agrotóxicos de interesse na concentração de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando-se tolueno como solvente extrator (definido no item 4.1.1) e acetonitrila como solvente dispersor (definido no item 4.1.2) mantendo-se as condições definidas na Tabela 2 e injetou-se $1,0 \mu\text{L}$ do extrato obtido no GC/ECD. Os ensaios foram realizados em duplicata e as médias das respostas cromatográficas obtidas estão apresentadas na Figura 7.



PTM: Parationa-metílica; CPF: Clorpirifós; PFF: Profenofós; BFT: Bifentrina; CLT: λ -cialotrina; PMT: Permetrina; CPT: Cipermetrina; DTM: Deltametrina.

Figura 7: Respostas cromatográficas dos analitos em extratos obtidos pela técnica LDS/DLLME nos ensaios com planejamento fatorial 2^2 para tempo de agitação e velocidade de agitação.

1 a 5: Ensaios realizados conforme planejamento fatorial descrito na Tabela 4.

A Tabela 8 contém os dados obtidos após avaliação dos resultados utilizando-se o teste ANOVA e análise dos gráficos de Pareto gerados. Os valores significativos (ao nível de 95% de significância) estão destacados em negrito. Apenas o agrotóxico parationa-metílica apresentou uma interação significativa entre a velocidade e tempo de agitação como esperado, pois, como já citado, a maior agitação permite que o equilíbrio seja atingido mais rapidamente. Os demais agrotóxicos apresentaram efeitos não-significativos para a interação entre os dois fatores.

A variação no tempo de agitação de 15 para 60 segundos aumentou significativamente a resposta cromatográfica para parationa-metílica, cipermetrina e deltametrina, sendo que para os demais agrotóxicos, essa variação da velocidade não se mostrou significativa. Além disso, a alteração da velocidade de 6 para 8, no vortex não foi significativa para nenhum dos agrotóxicos utilizados. Os melhores coeficientes de variação foram obtidos para os ensaios 2 e 4, onde utilizou-se o tempo de agitação de 60 s, independentemente da velocidade aplicada. Desta forma, a combinação de tempo de agitação e velocidade de agitação escolhida foi 60 segundos e velocidade 8 do vortex. Na Tabela 8 estão representados os efeitos para cada analito, nos ensaios com planejamento fatorial 2^2 .

Tabela 8 - Efeitos significativos obtidos nos ensaios com planejamento fatorial 2^2 para tempo de agitação e velocidade de agitação, na técnica LDS/DLLME

Fatores	PTM	CPF	PFF	BFT	CLT	PMT	CPT	DMT
1 (TAg)	12,56	-0,05	1,15	-0,005	0,27	0,35	2,89	4,26
2 (Vvtx)	1,49	1,30	2,09	1,64	1,23	1,50	-0,10	0,24
1 x 2	-6,32	-1,52	-1,10	-1,29	-1,22	-1,06	0,54	-0,002

1: Tempo de agitação (TAg); 2: Velocidade vórtex (Vvtx); 1x2: Interação entre os dois fatores

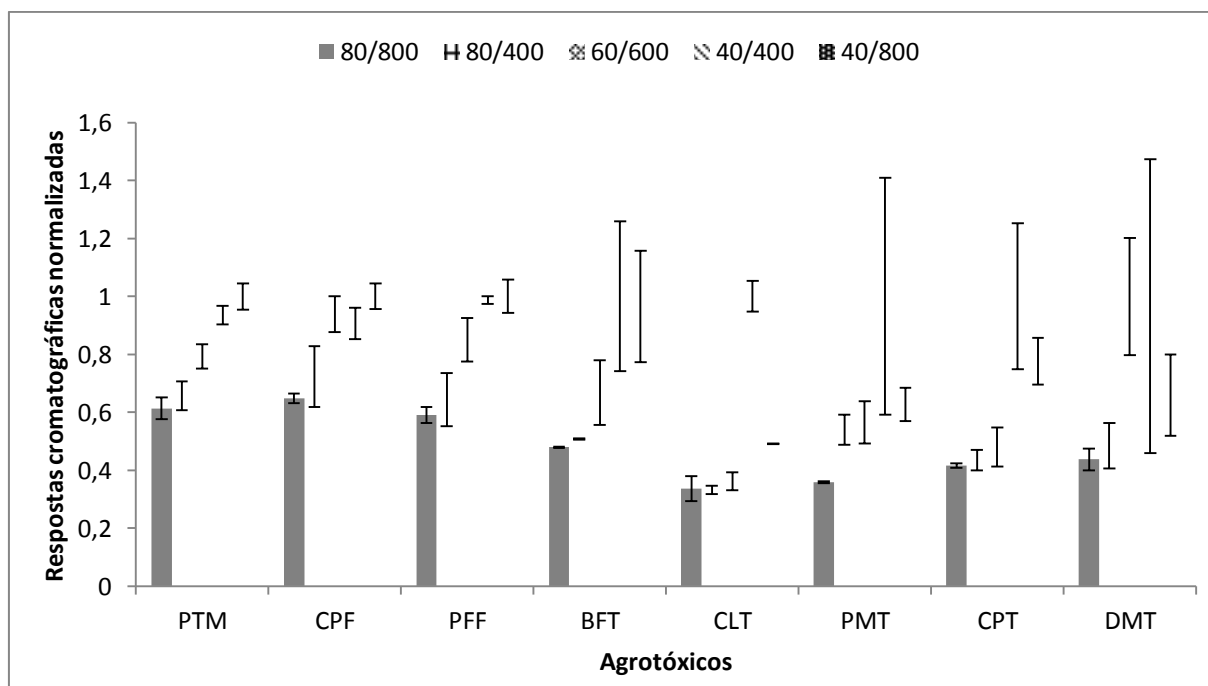
PTM: Parationa-metilica; CPF: Clorpirifós; PFF: Profenofós; BFT: Bifentrina; CLT: λ -cicalotrina; PMT: Permetrina; CPT: Cipermetrina; DMT: Deltametrina.

Os valores em negrito são significativos (ao nível de 95% de confiança).

4.1.5 Efeito dos volumes do solvente extrator e solvente dispersor

Os volumes dos solventes extratores e dispersores são fatores importantes para que o processo de extração LDS/DLLME alcance sua máxima eficiência, assim como um maior volume de fase orgânica disponível para se trabalhar (facilidade na coleta, quantidade suficiente de amostra para reinjeções, amostra para ambientação da seringa de injeção). Para a avaliação do efeito dos volumes do solvente extrator e solvente dispersor foi utilizado um planejamento fatorial 2^2 com ponto central (Tabela 5), utilizando-se tolueno como solvente extrator nos volumes de 40 e 80 μL e acetonitrila como solvente dispersor nos volumes de 400 e 800 μL . Os ensaios foram realizados em duplicata, exceto para o ponto central que foi realizado em triplicata. As médias das respostas cromatográficas obtidas estão apresentadas na Figura 8. Podemos observar que com a redução do volume de solvente extrator utilizado obteve-se as maiores respostas cromatográficas. O mesmo não se observa em relação à variação do volume do solvente dispersor. Os coeficientes de variação para cada replicata manteve-se abaixo de 20% exceto o experimento 6 (40/400 μL), onde os agrotóxicos bifentrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina apresentaram valores acima de 20%.

Verificou-se para adição de um volume de 40 μL e tolueno, obteve-se um volume de fase orgânica de 25 $\mu\text{L} \pm 0,2 \mu\text{L}$; para um volume de 60 μL , uma fase orgânica de 40 $\mu\text{L} \pm 0,2 \mu\text{L}$ e para um volume de 80 μL , uma fase orgânica de 60 $\pm 0,2 \mu\text{L}$.



PTM: parationa-metílica; CPF: clorpirifós; PFF: profenofós; BFT: bifentrina; CLT: λ -cialotrina; PMT: permetrina; CPT: cipermetrina; DMT: deltametrina.
 6 a 10: Ensaios realizados conforme planejamento fatorial descrito na Tabela 5.

FIGURA 8: Respostas cromatográficas dos analitos em extratos obtidos pela técnica LDS/DLLME nos ensaios com planejamento fatorial 2^2 para volume do solvente extrator e volume do solvente dispersor.

Na Tabela 9 estão representados os valores dos efeitos das variáveis para as respostas cromatográficas de analito, nos ensaios com planejamento fatorial 2^2 para volume do solvente extrator e volume do solvente dispersor, obtidos após teste ANOVA e avaliação por gráficos de Pareto. Os valores em negrito são aqueles que apresentaram significância ao nível de 95%. A partir destes valores podemos observar que os agrotóxicos parationa-metílica, clorpirifós, profenofós, bifentrina, lambda-cialotrina, permetrina e cipermetrina, apresentaram um comportamento similar, onde ocorre aumento significativo da resposta cromatográfica para a redução do volume do solvente extrator de 80 μ L para 40 μ L. Deltametrina não apresentou resposta significativa para a redução do volume na variação citada. Por outro lado, tanto a variação de solvente dispersor de 400 μ L para 800 μ L, quanto o efeito secundário das variáveis não alterou significativamente as respostas cromatográficas destes agrotóxicos. Devido às dificuldades operacionais no uso de volumes de fase orgânica abaixo de 50 μ L, optou-se por utilizar o volume de 80 μ L para o tolueno (solvente extrator), e o volume de 400 μ L de acetonitrila (solvente dispersor). Dessa forma, diminui-se o consumo de acetonitrila e mantém-se a operacionalidade do processo de extração LDS/DLLME.

Tabela 9 - Efeitos significativos obtidos nos ensaios com planejamento fatorial 2² para volume de solvente extrator e volume de solvente dispersor, na técnica LDS/DLLME.

Fatores	PTM	CPF	PFF	BFT	CLT	PMT	CPT	DMT
1 (Extract)	- 9,76	- 6,01	-8,50	- 4,72	- 2,51	-2,95	- 5,65	-2,02
2 (Disper)	-1,58	-1,90	-0,73	-0,30	1,18	-2,14	-1,48	-1,02
1 x 2	0,31	0,21	-0,45	0,30	-1,14	0,78	1,25	0,75

1: Volume solvente extrator (Extract); 2: volume solvente dispersor (Disper); 1x2: Interação entre os dois fatores
PTM: Parationa-metilica; CPF: Clorpirifós; PFF: Profenofós; BFT: Bifentrina; CLT: λ-cialotrina; PMT: Permetrina; CPT: Cipermetrina; DMT: Deltametrina.
Os valores não apresentados não são significativos (ao nível de 95% de confiança).

4.2. Validação da técnica de extração LDS/DLLME

No processo de validação do método desenvolvido a partir da otimização da técnica LDS/DLLME foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: seletividade, linearidade e faixa de trabalho, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão e exatidão. O processo de validação possui duas funções básicas: garantir o atendimento aos critérios de aceitação preconizados, através dos parâmetros de desempenho avaliados, garantindo a qualidade metrológica além de permitir a redução e o controle de fatores que podem levar a imprecisão ou inexatidão de um dado apresentado (MAPA, 2011). As condições a serem validadas são as obtidas no processo de otimização, descritos no item 4.1.1 ao 4.1.5 e estão descritas na Tabela 10.

Tabela 10 - Condições otimizadas para o processo de extração LDS/DLLME.

Volume de amostra*	5 mL
Solvente dispersor	Acetonitrila
Volume de Solvente Dispersor	400 µL
Solvente extrator	Tolueno
Volume de Solvente Extrator	80 µL
Modo de agitação	Vortex / vel. 8
Tempo de extração	60 segundos
Tempo de centrifugação*	5 minutos / 3200 rpm
Volume de fase orgânica recuperada*	50 µL

* Não otimizados.

A seletividade é dada pela capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a

sua determinação em uma amostra complexa, e garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Para avaliar a seletividade do método de extração foram injetados e comparados: o solvente puro (A), padrão dos agrotóxicos em solvente puro (B), extrato da amostra isento de agrotóxicos (branco) (C) e o extrato da amostra fortificada com os agrotóxicos (D).

A Figura 9 contém dois cromatogramas, sendo o cromatograma A, referente ao tolueno puro e o cromatograma B, referente aos padrões em tolueno. Os números de 1 a 8 são referentes aos picos dos agrotóxicos. Observa-se que o tolueno possui alguns picos, porém os mesmos não se sobrepõem aos picos dos agrotóxicos avaliados. Da mesma forma, a Figura 10 contém a comparação de dois cromatogramas, sendo um cromatograma (C) de uma amostra isenta de agrotóxicos submetida ao processo de extração LDS/DLLME, conforme condições otimizadas descritas na Tabela 10 e, um cromatograma (D) de uma amostra fortificada com agrotóxicos em uma concentração equivalente a 5LQ, também submetida ao processo de extração LDS/DLLME, conforme condições otimizadas na Tabela 10. Pode-se observar que apesar da existência de picos no extrato da amostra isenta de agrotóxicos, a seletividade do método foi atendida, conforme observado na Figura 10.

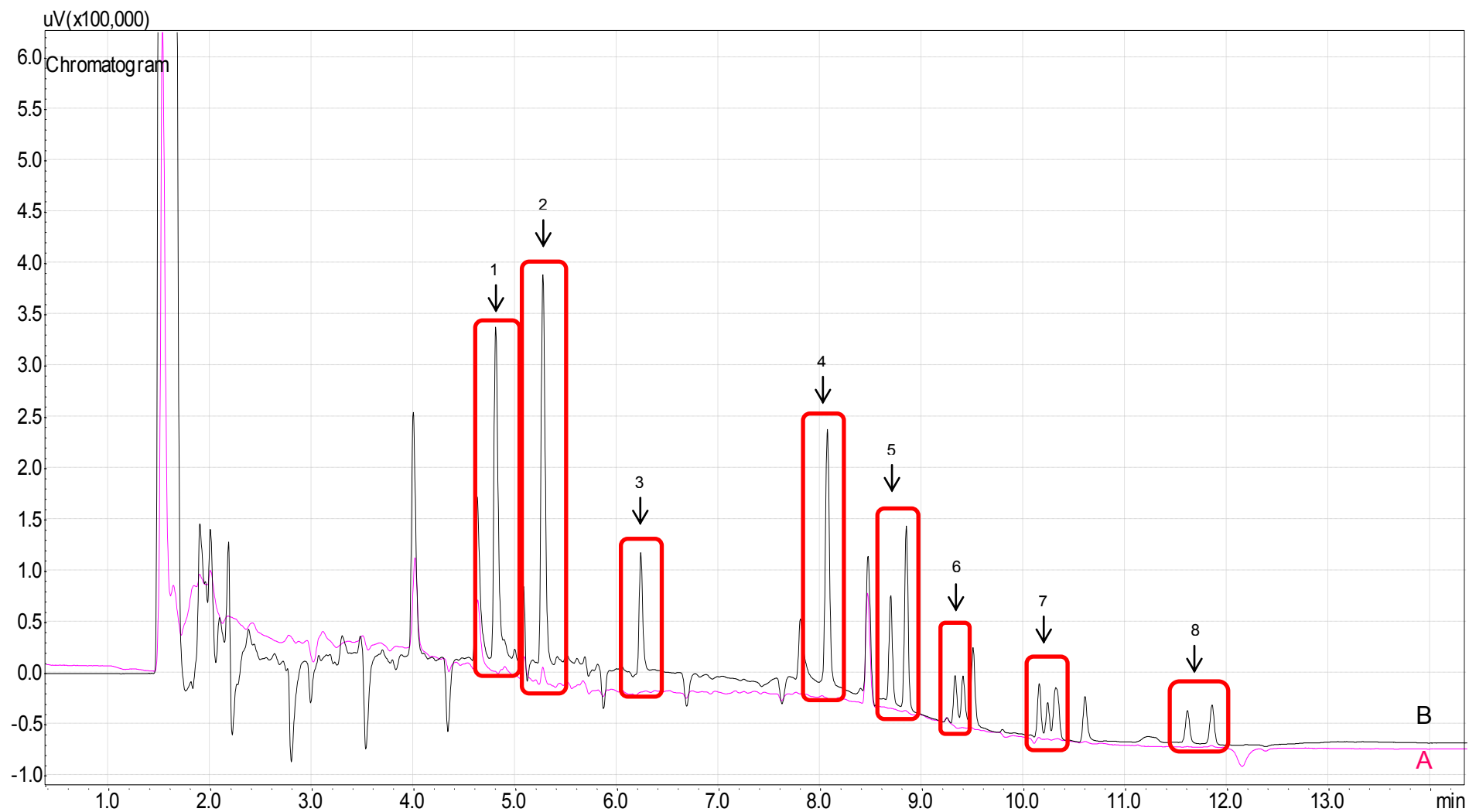


Figura 9: Cromatograma do Tolueno puro (A) comparado com cromatograma dos padrões de agrotóxicos em tolueno (B).

Analitos: 1: Parationa-metílica; 2- Clorpirifós; 3: Profenofós; 4: Bifentrina; 5: λ -cialotrina; 6: Permetrina; 7: Cipermetrina; 8: Deltametrina.

Condições cromatográficas: 150 °C (1 min); 30 °C/min; 210 °C (1 min); 30 °C/min; 250 °C (2 min); 20 °C/min; 290 °C (5 min); tempo de corrida de 14,3 min.

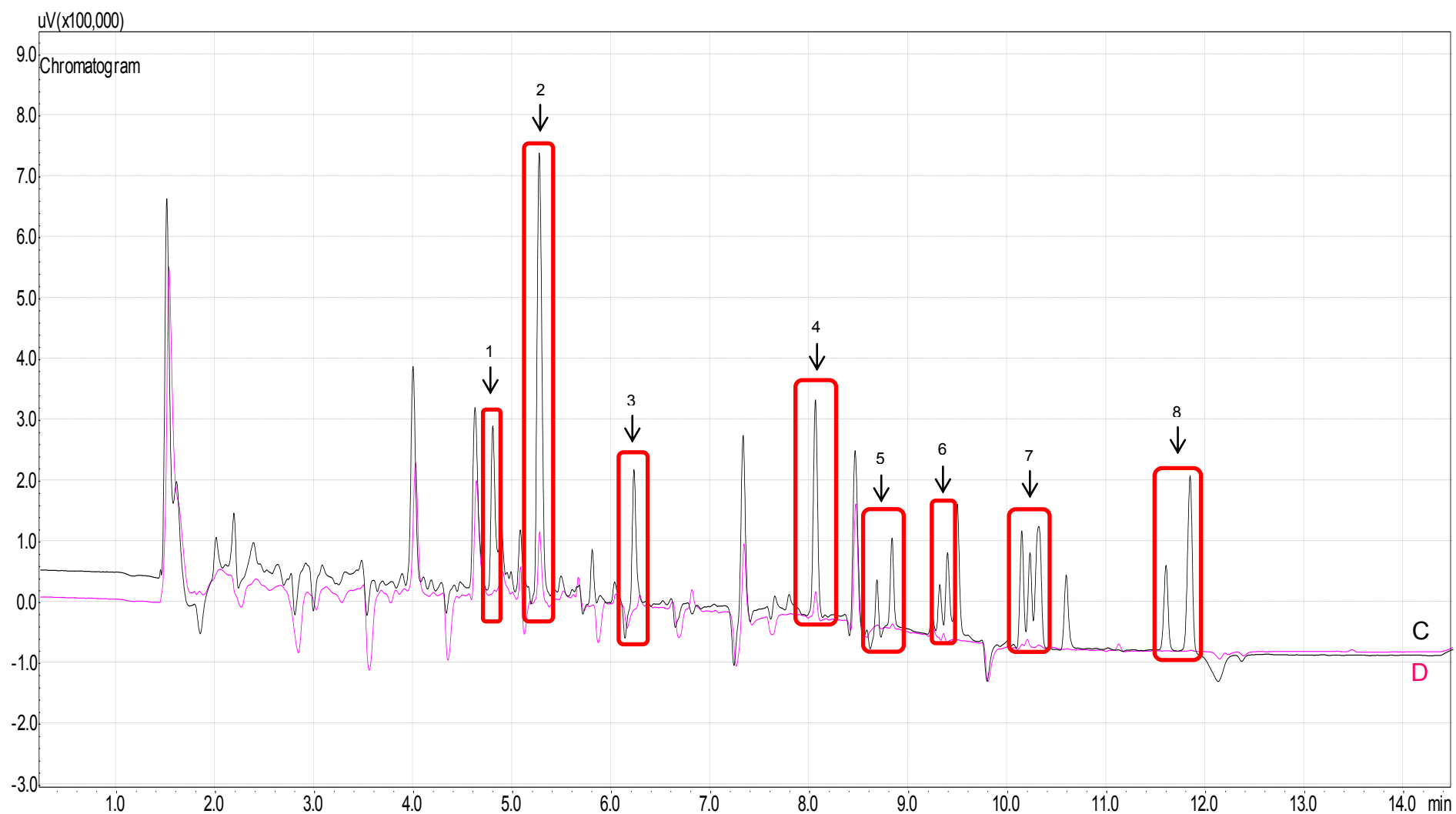


Figura 10: Cromatograma do extrato obtido pelo processo de extração LDS/DLLME de uma amostra de concentração 5xLQ (C) comparado com o cromatograma do extrato obtido pelo mesmo processo de uma amostra isenta de agrotóxicos (D).

Analitos: 1-Parationa-metilica; 2-Clorpirifós; 3-Profenofós; 4-Bifentrina; 5-Cialotrina; 6-Permetrina; 7-Cipermetrina; 8-Deltametrina.

Condições cromatográficas: 150 °C (1 min); 30 °C/min; 210 °C (1 min); 30 °C/min; 250 °C (2 min); 20 °C/min; 290 °C (5 min); tempo de corrida de 14,3 min.

Para realizar o estudo de linearidade, foi construída uma curva analítica para cada agrotóxico de interesse, fortificando-se amostras da matriz estudada (água Mili-Q) com quantidades adequadas das soluções-trabalho dos agrotóxicos. O estudo da linearidade foi realizado inicialmente injetando-se extratos LDS/DLLME de amostras fortificadas em 10 níveis de concentração. A faixa de concentração utilizada inicialmente foi de 50 ng L⁻¹ a 20000 ng L⁻¹ (20 µg L⁻¹), para cada agrotóxico. O ponto inicial da curva equivaleu à metade do limite de quantificação estimado para a parationa-metílica, pela relação sinal-ruído. Cada agrotóxico apresentou uma resposta referente a um intervalo de concentração, de acordo com suas características, após processo de extração LDS/DLLME. Mediante esta informação prévia, construiu-se novas curvas analíticas, agora com 6 níveis de concentração, fortificando-se as amostras de água Mili-Q, de acordo com os intervalos obtidos na primeira etapa. A Tabela 11 contém os valores referentes à equação da reta, faixa linear, LOD e LOQ e seus respectivos coeficientes de correlação para cada agrotóxico avaliado. A linearidade para o método LDS/DLLME possui o mesmo intervalo que a faixa de trabalho. Os valores de LOD e LOQ foram determinados com base nos parâmetros da curva analítica, para cada agrotóxico.

TABELA 11 - Valores de LOD, LOQ, Coeficiente de correlação, equação da reta e EF (fator de enriquecimento) para cada agrotóxico analisado pelo método LDS/DLLME-GC/ECD.

ANALITOS	PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO					
	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)	FAIXA LINEAR (ng L ⁻¹)	EQUAÇÃO DA RETA	R	EF
PARATIONA	33,0	110,0	110 – 1100	y = 734,73x – 20182	0,995	56,8
CLORPIRIFÓS	256,0	774,0	780 – 7800	y = 430,37x + 167282	0,997	48,0
PROFENOFÓS	80,0	243,0	250 -2500	y = 471,89x – 48479	0,996	50,0
BIFENTRINA	278,0	842,0	850 – 8500	y = 182,73x + 64010	0,998	21,4
CIALOTRINA	70,0	213,0	220 – 2200	y = 487,74x – 21611	0,999	28,4
PERMETRINA	481,0	1458,0	1500 – 15000	y = 86,514x + 38537	0,996	56,0
CIPERMETRINA	251,0	761,0	780 – 7800	y = 422,93x – 15257	0,995	27,0
DELTAMETRINA	381,0	1152,0	1200 – 12000	y = 190,89x – 91240	0,999	25,0

Podemos observar que os valores obtidos para os coeficientes de correlação apresentam-se acima de 0,99, que é o valor recomendado pela ANVISA para métodos analíticos (ANVISA, 2003).

Também foram avaliados os gráficos de resíduos obtidos a partir dos valores calculados pela curva analítica de cada agrotóxico. Os valores normalizados para os resíduos foram obtidos calculando-se os valores a partir da equação obtida da curva analítica, dividindo esses valores calculados pelo valor do erro relativo ao termo y. Um exemplo de gráfico de resíduo normalizado é mostrado na Figura 11.

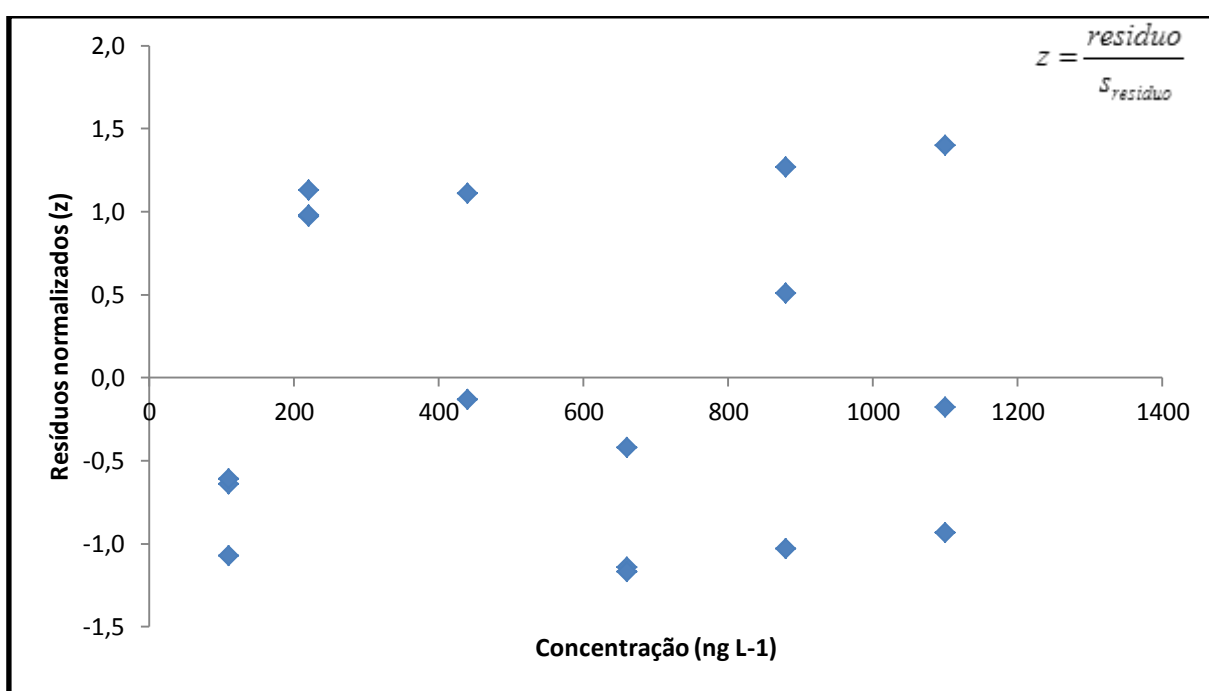


Figura 11: Gráfico de resíduos normalizados para a curva analítica da parationa-metílica em amostras de água extraídas pelo método LDS/DLLME.

Para os demais agrotóxicos o comportamento dos resíduos foi semelhante, mostrando a inexistência de uma tendência.

Para os ensaios de precisão e exatidão, utilizou-se 3 níveis de concentração, em triplicata (25, 50 e 75% da faixa de trabalho), para cada agrotóxico. A repetitividade foi avaliada através das respostas cromatográficas dos extratos relacionadas com a curva analítica, injetada no mesmo dia que os extratos das amostras fortificadas, para cada agrotóxico. Foram calculados os coeficientes de variação (CV) para as médias de cada nível de concentração, de cada agrotóxico. Os resultados para a repetibilidade se encontram na Tabela 12. Para os ensaios de repetibilidade em um único dia, os resultados de %recuperação para cada

agrotóxico ficou de acordo com a faixa sugerida pelos organismos normativos, sendo este de 70 a 120 % (ANVISA, 2003). Os coeficientes de variação também se apresentaram dentro da faixa esperada, para o nível de concentração utilizado no trabalho, que seria de até 35% de variação (MAPA, 2011).

Para o ensaio de precisão intermediária, realizou-se o mesmo procedimento realizado para os ensaios de repetitividade, porém em mais dois dias alternados, já que o ensaio de repetitividade também atende ao ensaio de precisão interna, no primeiro dia. Na Tabela 13 são apresentados os resultados da precisão intermediária tanto da concentração, como para a média da recuperação em 3 dias. A exatidão do método para os 3 dias avaliados apresentou-se de acordo com o intervalo aceitável, de 70 a 120% para as % recuperações dos analitos.

Desta forma podemos concluir que o processo de validação da metodologia LDS/DLLME para os 8 agrotóxicos de interesse está de acordo com as normas definidas pela ANVISA (ANVISA, 2003).

A Figura 12 representa o esquema de aplicação da microtécnica LDS/DLLME para amostras de água.

TABELA 12 - Valores de repetitividade e recuperação para os analitos validados – 1º dia

ANALITOS	REPETITIVIDADE (n=3)				
	Concentração Nominal (ng L ⁻¹)	Nível de Concentração LOQ	Média Concentração (ng L ⁻¹)	/ Recuperação Média	CV (RSD /)
PARATIONA	275	2,5 LOQ	252	91,6	1,54
	550	5,0 LOQ	627	114	2,90
	825	7,5 LOQ	906	109,8	5,54
CLORPIRIFÓS	1950	2,5 LOQ	1915	98,2	2,67
	3900	5,0 LOQ	4400	112,8	6,21
	5850	7,5 LOQ	6068	103,7	9,55
PROFENOFÓS	625	2,5 LOQ	555	88,8	8,39
	1250	5,0 LOQ	1508	120,7	2,63
	1875	7,5 LOQ	2026	108,1	6,95
BIFENTRINA	2125	2,5 LOQ	2471	116,3	6,31
	4675	5,0 LOQ	4587	97,3	6,44
	6375	7,5 LOQ	6684	104,8	15,51
CIALOTRINA	550	2,5 LOQ	551	100,1	4,53
	1100	5,0 LOQ	1110	100,9	8,44
	1650	7,5 LOQ	1660	100,6	5,56
PERMETRINA	3750	2,5 LOQ	3387	90,3	15,00
	7500	5,0 LOQ	7819	104,3	7,97
	11250	7,5 LOQ	11486	102,1	11,58
CIPERMETRINA	1950	2,5 LOQ	1754	90,0	4,44
	3900	5,0 LOQ	4003	102,7	6,24
	5850	7,5 LOQ	5973	102,1	10,86
DELTAMETRINA	3000	2,5 LOQ	2917	97,2	4,06
	6000	5,0 LOQ	6631	110,5	5,82
	9000	7,5 LOQ	8847	98,3	12,69

TABELA 13 - Valores de precisão intermediária e exatidão após 3 dias de avaliação da reprodutibilidade para os analitos validados

ANALITOS	PRECISÃO INTERMEDIÁRIA (n=3)				
	Concentração Nominal (ng L ⁻¹)	Nível de Concentração LOQ	Média Concentração (ng L ⁻¹) (3 dias)	Exatidão Média / recuperação (3 dias)	CV (RSD /) Recuperação
PARATIONA	275	2,5 LOQ	233	85	10,85
	550	5,0 LOQ	545	99	14,78
	825	7,5 LOQ	775	94	12,81
CLORPIRIFÓS	1950	2,5 LOQ	1778	94	10,81
	3900	5,0 LOQ	3606	95	18,32
	5850	7,5 LOQ	4896	86	19,65
PROFENOFÓS	625	2,5 LOQ	582	93	5,53
	1250	5,0 LOQ	1351	108	10,63
	1875	7,5 LOQ	1351	96	10,63
BIFENTRINA	2125	2,5 LOQ	2359	111	9,60
	4675	5,0 LOQ	4547	97	6,02
	6375	7,5 LOQ	5772	91	21,15
CIALOTRINA	550	2,5 LOQ	513	93	7,52
	1100	5,0 LOQ	1119	102	11,58
	1650	7,5 LOQ	1379	84	29,60
PERMETRINA	3750	2,5 LOQ	3229	86	11,27
	7500	5,0 LOQ	7019	94	14,30
	11250	7,5 LOQ	9636	86	23,36
CIPERMETRINA	1950	2,5 LOQ	1826	94	10,65
	3900	5,0 LOQ	3672	94	13,71
	5850	7,5 LOQ	5055	86	24,22
DELTAMETRINA	3000	2,5 LOQ	2931	98	7,94
	6000	5,0 LOQ	6085	101	12,69
	9000	7,5 LOQ	7928	88	17,30

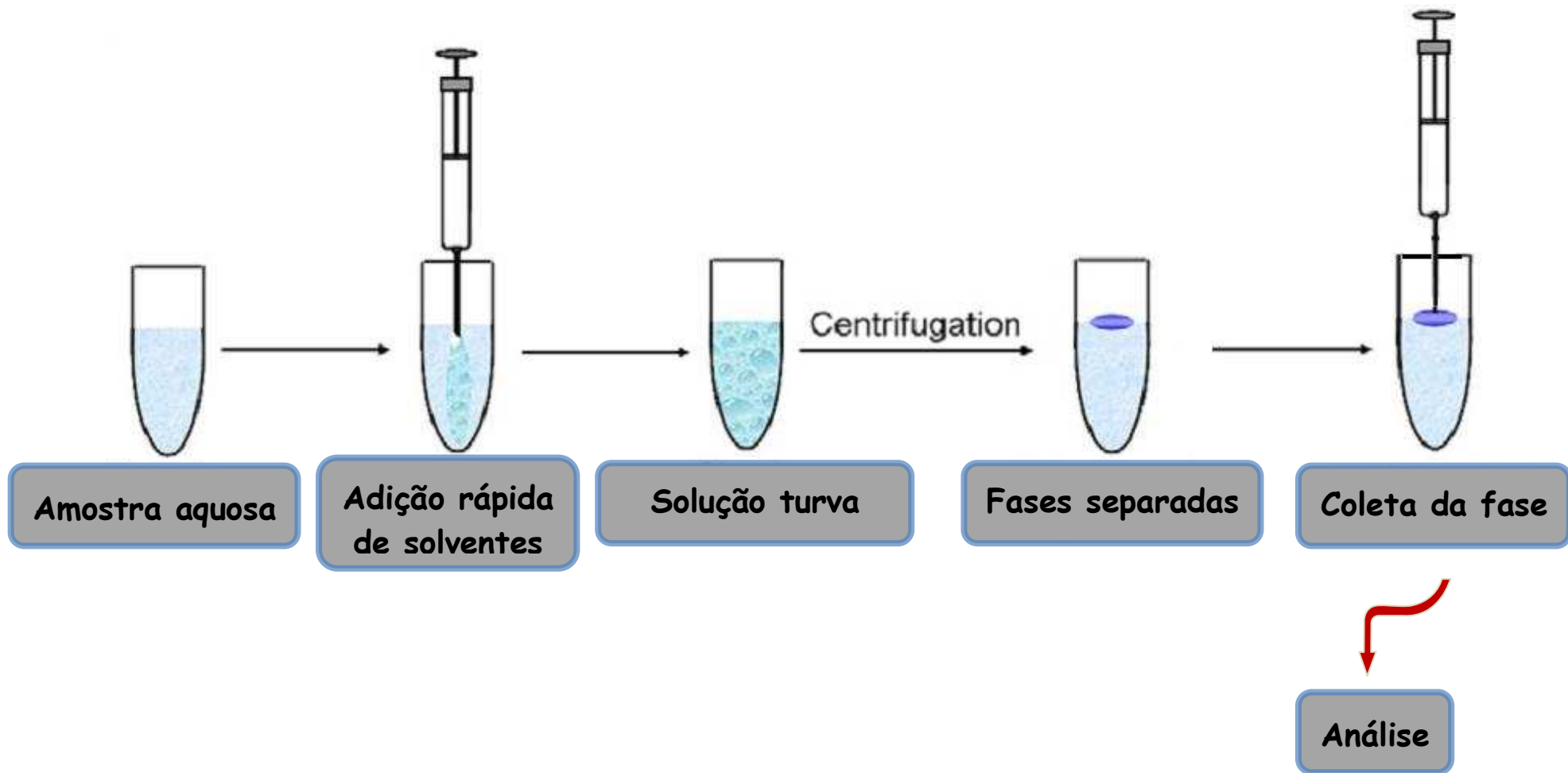


FIGURA 12: Esquema da microtécnica LDS/DLLME aplicada em amostras aquosas (adaptado de Kokurová *et al*, 2012).

5. CONCLUSÃO

A técnica de extração LDS/DLLME mostrou-se adequada para a análise de agrotóxicos organofosforados e piretróides em amostras de água. O tipo de solvente dispersor não afeta significativamente os resultados e o tipo de solvente extrator influencia na resposta cromatográfica, sendo que os melhores resultados foram obtidos usando o solvente menos apolar. O método otimizado tem LOD e LOQ que atendem a legislação para LMR em água potável. Os resultados da validação são concordantes com alguns resultados já publicados.

CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICA DE EXTRAÇÃO SLE/LTP HIFENADA COM A TÉCNICA LDS/DLLME PARA AGROTÓXICOS ORGANOFOSFORADOS E PIRETRÓIDES EM AMOSTRAS DE SOLO.

1. INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos aplicados em plantas ou diretamente no solo para o controle de pragas pode contaminar este último, pois quando se aplica o agrotóxico uma parte atinge o alvo, enquanto outra parte é depositada sobre o solo onde ocorrem os diversos processos de degradação e transferência para vários compartimentos ambientais (CASTRO *et al.*, 2001). Isso faz necessária a utilização de métodos rápidos e precisos para determinação de agrotóxicos e seus derivados, em solos. Usualmente, para extração de compostos orgânicos de solos, faz-se uma extração sólido-líquido com água ou solventes orgânicos. A extração sólido-líquido convencional demanda grandes massas de amostra, volume de solvente e tempo de extração (SATTAR, 1990; IBÁÑEZ *et al.*, 2005). A extração por soxhlet é exaustiva e a quente, podendo durar até 48 h, de acordo com o protocolo utilizado, além de grandes volumes de solvente (PUIG & BARCELÓ, 1994; GIBSON *et al.*, 2005). Recentemente, duas técnicas originalmente desenvolvidas para aplicação em amostras de alimentos têm sido aplicadas em amostras de solo. São elas a técnica QuEChERS (**Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **R**udgger and **S**afe), desenvolvida por Anastassiades e colaboradores, em 2003 e a extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) (LENTZA-RIZOS *et al.*, 2001; GOULART, *et al.*, 2008). A técnica QuEChERS foi aplicada na determinação de agrotóxicos em solos (LESUEUR *et al.*, 2008); trialometas (THMs) e BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) em solos (PINTO *et al.*, 2011) além de fármacos e esteroides também em solo (SALVIA *et al.*, 2013) entre outros trabalhos. A técnica SLE/LTP, aplicada originalmente em óleo de oliva para determinação de organofosforados (LENTZA-RIZOS *et al.*, 2001), e posteriormente aplicada na análise de piretróides e lactonas macrocíclicas em leite (GOULART, *et al.*, 2008; RÜBENSAM *et al.*, 2011), também foi utilizada na determinação de piretróides em tomate (PINHO *et al.*, 2010a), carbamatos em suco de uva e leite achocolatado (GOULART, *et al.*, 2012), cocaína em fígado humano (MAGALHÃES, *et al.*, 2013) e também piretróides em solos, além de outras classes de agrotóxicos (PINHO *et al.*, 2010b; RIGUEIRA *et al.*,

2013, SOUSA, 2012). Nestas duas técnicas, o volume da fase extratora costuma ter proporção 1:1 com a massa de solo (QuEChERS) ou no máximo 2:1 (SLE/LTP). A desvantagem dessas técnicas é não apresentar fator de enriquecimento sendo geralmente necessário uma etapa de concentração que pode ser por evaporação em evaporador rotativo (YASIN *et al.*, 1996) ou uma segunda etapa de extração utilizando-se técnicas de microextração (BOYD-BOLAND & PAWLISZYN, 1995; COLOMBINI *et al.*, 2004).

Uma alternativa para contornar o baixo fator de enriquecimento seria o uso de microtécnicas de extração, porém, as mesmas não são adequadas para amostras sólidas, que podem absorver a fase extratora. Nesse caso, a hifenação de duas técnicas, sendo uma de pré-extração e clean up e outra de microextração, proporcionando melhores fatores de concentração, surge como uma opção interessante para o processo de extração de analitos em amostras sólidas, onde necessariamente, utiliza-se uma etapa de pré-extração. Um dos primeiros trabalhos de hifenação de duas técnicas de extração já estabelecidas relata a combinação de SPE com SPME na determinação do herbicida feniluréia em amostras de água, obtendo-se limites de detecção abaixo de $1,0 \text{ ng L}^{-1}$ (GERECKE *et al.*, 2001). Lambropoulou e Albanis, em 2004, descrevem um procedimento para análise de vinclozin em solo, onde a pré-extração é realizada com o auxílio de ultrassom e mistura de solventes e após, é aplicada a técnica de HF-LPME (LAMBROPOULOU & ALBANIS, 2004). Basheer e colaboradores, em 2005, relataram a aplicação de extração assistida por micro-ondas (MAE) combinada com microextração em fase líquida (LPME) e membrana de fibra oca (HFM) na determinação de poluentes orgânicos persistentes em sedimento marinho (BASHEER *et al.*, 2005). A técnica SDME foi utilizada no modo headspace (HS) combinada com extração assistida por micro-ondas (MAE), na determinação de paeonol, princípio ativo em medicamentos chineses tradicionais. As figuras de mérito para o processo de validação foram 10,5 % CV, 88% de recuperação e LOD de $2 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ (DENG *et al.*, 2006). Em 2008, um trabalho de determinação de resíduos de agrotóxicos organoclorados em sedimentos estuarinos relatou o uso de microextração em fase sólida no modo headspace (HS-SPME) combinado com pré-extração por micro-ondas (MAE), utilizando cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa como detector (CG/MS). Foram avaliados 10 (dez) princípios ativos que apresentaram LOD entre

0,005 a 0,11 ng g⁻¹ de organoclorados por massa de sedimento seco, e % CV entre 8 e 17 % (CARVALHO *et al.*, 2008).

Em 2007, Fattahi e colaboradores apresentaram um estudo combinando a técnica SPE com a microtécnica DLLME, na análise de clorofenóis em água. A hifenação das duas técnicas mostrou-se efetiva, permitindo LOD abaixo dos encontrados nas duas técnicas separadamente, sem afetar o coeficiente de variação (FATTAHI *et al.*, 2007). Wu e colaboradores apresentaram um trabalho em 2009, combinando extração em fase sólida dispersiva (dSPE) com DLLME na determinação de herbicidas sulfonilureia, em amostras de solo, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodo (HPLC/DAD). Esta combinação proporcionou recuperações entre 76 e 92% e CVs entre 4,2 e 7,4 %. Os LODs para os herbicidas avaliados ficaram entre 0,5 e 1,2 ng g⁻¹ (WU *et al.*, 2009b). QuEChERS e DLLME tem sido combinados para determinação de diversas classes de compostos em alimentos e derivados, tais como inseticidas neonicotinóides em licor de mel (JOVANOVIĆ *et al.*, 2014), bisfenol A e B em vegetais e frutos enlatados (CUNHA & FERNANDES, 2013), várias classes de agrotóxicos em tomate (MELO *et al.*, 2012) e várias classes de agrotóxicos em arroz (CUNHA & FERNANDES, 2011), etc.

A aplicação da técnica SLE/LPT em solos tem sido avaliada por alguns pesquisadores (PINHO *et al.*, 2010b; RIGUEIRA *et al.*, 2013), e devido às suas características de baixo custo, facilidade operacional poder de clean-up, torna-se uma excelente opção na hifenação com microtécnicas, como a LDS/DLLME. Dessa maneira, o objetivo deste capítulo é abordar pela primeira vez a hifenação da técnica de pré-extração e *clean-up* SLE/LPT com a técnica LDS/DLLME para determinação de resíduos de agrotóxicos (organofosforados e piretróides) em solo.

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais

- Desenvolver metodologia combinando as técnicas extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) e a microextração líquido-líquido dispersiva com solvente de baixa densidade (LDS/DLLME) para a determinação de organofosforados e piretróides em solo, por cromatografia gasosa.

Objetivos específicos

- Otimizar a técnica de extração SLE/LTP para os agrotóxicos organofosforados e piretróides em solo, avaliando-se os fatores: composição da fase orgânica, da mistura extratora, volume de fase orgânica e volume total da mistura extratora.
- Otimizar a técnica de extração DLLME para os agrotóxicos organofosforados e piretróides em solo, avaliando-se a variação do parâmetro volume de extrato obtido pela técnica SLE/LTP.
- Combinar a técnica de extração SLE/LTP com a técnica de microextração LDS/DLLME para a extração dos agrotóxicos em solo.
- Validar o novo método proposto para determinação dos analitos, para os parâmetros: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão intermediária e exatidão.
- Aplicar o método de extração hifenado SLE/LTP-LDS/DLLME em amostras de solo de diferentes regiões.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e soluções

Os solventes e padrões utilizados foram:

- tolueno, 99% (Merck, Rio de Janeiro),
- acetonitrila, 99,5% - grau HPLC (Sigma-Aldrich, USA),
- cipermetrina, 92,4% m/m, (Sygenta, Brasil)
- λ -cialotrina, 86,5% m/m, (Sygenta, Brasil)
- deltametrina, 99% m/m (Sygenta, Brasil)
- parationa-metílica, 99% m/m, (Sygenta, Brasil).
- profenofós, 92% m/m (Dr. Erchenstoffer, Germany)
- bifentrina-92,2% m/m (FMC, Brasil).

Foram preparadas soluções-estoque dos padrões, na concentração de 1000,0 mg L⁻¹, em acetonitrila e, a partir destas, soluções-trabalho na concentração de 10,0 mg L⁻¹, em acetonitrila. As diluições necessárias foram realizadas a partir das soluções de trabalho e todas foram armazenadas à temperatura de aproximadamente -20 °C. Na etapa de validação foram utilizadas amostras de solo coletadas na cidade de Viçosa, classificado como latossolo vermelho-amarelo, coletado na Vila Gianetti, no campus da UFV, na profundidade de aproximadamente 20 cm, em área isenta de resíduos de agrotóxicos. Os analitos utilizados neste capítulo se encontram na Tabela 1, exceto clorpirifós e permetrina.

3.2 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos nesta etapa:

- Agitador vortex modelo CERTOMAT® MV (B. BRAUN INTERNACIONAL, Melsugen, Alemanha)
- Centrífuga modelo 222-T28 (QUIMIS, Rio de Janeiro, Brasil).
- Balança analítica modelo BP221 S (SARTORIUS, Göttingen, Alemanha)
- Freezer 280 L (CONSUL, Minas Gerais, Brasil)
- Cromatógrafo a gás modelo 17A (SHIMADZU, Kioto, Japão) equipado com um detector por captura de elétrons (GC/ECD) e injetor split/splitless, coluna capilar

de sílica fundida (30 m x 0,25 mm x 0,10 µm de espessura de filme), da Phenomenex (USA), modelo ZB-5 (apolar, 5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano).

- As condições cromatográficas utilizadas foram:

* Rampa de temperatura:

150 °C (1 min) $\xrightarrow{30\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}}$ 210 °C (1 min) $\xrightarrow{30\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}}$ 250 °C (2 min) $\xrightarrow{20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}}$ 290 °C (5 min)

- A corrida cromatográfica durou 14,3 minutos.

- O detector por captura de elétrons (ECD) foi mantido a 300 °C e o injetor split/splitless foi mantido a 280 °C.

- Nitrogênio 99,999% puro foi usado com gás de arraste, a uma vazão de 1,2 mL min⁻¹ e o gás de *make-up* foi mantido em 55 kPa.

- O volume injetado foi de 1,0 µL, a uma razão de Split de 1:5.

3.3 EXTRAÇÃO SÓLIDO LÍQUIDO COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA HIFENADA COM MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA COM SOLVENTE DE BAIXA DENSIDADE (SLE/LTP-LDS/DLLME)

3.3.1 Preparo e fortificação das amostras de solo

As amostras de solos utilizadas no processo de otimização e validação do método foram obtidas de um terreno, na vila Gianeti, na Universidade Federal de Viçosa, local sem nenhuma atividade agrícola, livre de agrotóxicos, em Viçosa-MG. Foram destorradadas, peneiradas, secas ao ar à temperatura ambiente e armazenadas em sacos plásticos adequados. Fortificou-se 2,0 g de solo com os agrotóxicos de interesse em concentrações definidas de acordo com a etapa do trabalho. Diferentes volumes de solvente utilizado no preparo da solução trabalho (normalmente acetonitrila) foram acrescentados às amostras de solo fortificadas para garantir homogeneidade no processo de fortificação, ficando todas amostras expostas a um mesmo volume de solução. As amostras foram então homogeneizadas em vortex e mantidas em repouso de 12 horas até que todo solvente evaporasse. Posteriormente estas amostras foram submetidas ao procedimento de extração SLE/LTP-LDS/DLLME.

3.3.2 Princípio do método empregando a hifenação das técnicas SLE/LTP-LDS/DLLME para determinação de agrotóxicos em solo

A extração SLE/LTP-LDS/DLLME consiste de duas etapas, sequenciais, sendo a primeira, uma extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura (SLE/LTP) e a segunda uma microextração líquido-líquido dispersiva com solvente de baixa densidade (LDS/DLLME). Na primeira etapa, adiciona-se à 2,0 g de solo previamente fortificado, 4,5 mL de acetonitrila (ACN) e 4,5 mL de água (H₂O) em frascos de vidro de 22 mL, com tampa rosqueável. Agita-se em vortex por 1 minuto e leva-se os tubos para um refrigerador (-20 °C) por cerca de 6 h, para separação das fases. Recupera-se 2,5 mL de extrato orgânico e estoca-se em frascos de vidro de 4,5 mL. Na segunda etapa do procedimento de extração, mistura-se 80 µL de tolueno (TOL) em 1,0 mL de extrato orgânico obtido na etapa anterior e introduz-se, rapidamente, em um tubo de ensaio de 10 mL, com tampa rosqueável, contendo 5,0 mL de água destilada. Agita-se a mistura em vortex, por 1 minuto e centrifuga-se por 5 minutos. Recupera-se 50 µL da fase orgânica formada na superfície da solução aquosa e armazena-se em frasco de vidro de 2 mL com insert redutor de volume (150 µL). Retira-se uma alíquota de 1,0 µL dessa solução e injeta-se no GC/ECD. Os dados obtidos foram tratados pelo “software” Simadzu CG Solution e posteriormente avaliados pelo software Statistica 8.0.

3.4 Otimização da técnica SLE/LTP - LDS/DLLME

O processo de extração SLE/LTP-LDS/DLLME possui duas etapas, onde a etapa de SLE/LTP tem como característica a extração dos analitos da amostra sólida e a capacidade de realizar *clean-up* (GOULART *et al.*, 2008), enquanto a etapa LDS/DLLME tem a capacidade de concentrar os analitos em um pequeno volume de solvente. Para melhoria do processo global, cada etapa foi otimizada de acordo com suas características.

3.4.1 Otimização da etapa SLE/LTP

Para a otimização da etapa SLE/LTP, realizou-se um planejamento fatorial 2³ com ponto central (13 ensaios), conforme Tabela 14, buscando obter a melhor resposta cromatográfica dos analitos avaliados. Na otimização os fatores razão de composição da fase orgânica (R₁); volume total da mistura extratora (V_T) e razão

volume fase orgânica para volume da mistura extratora (R_2) foram avaliados. O ponto central foi realizado em quintuplicata. O fator V_T é o volume total da mistura extratora que será avaliado nos níveis 12 mL e 9 mL. O Fator R_1 é a razão entre o volume de acetato de etila (AcOEt) e o volume da fase orgânica, que é tem como base a acetonitrila (ACN). As razões R_1 a serem avaliadas são 0 e 0,125 de AcEt, na fase orgânica. E o fator R_2 é a razão entre o volume da fase orgânica (ACN + AcOEt) e o volume total da mistura extratora (FO + H_2O), que será avaliada nas razões 0,5 e 0,667.

Tabela 14 - Condições experimentais do planejamento fatorial 2^3 com ponto central (5 pontos) – valores reais e fatores codificados.

Ensaio	V_{ACN} (mL)	V_{AcOEt} (mL)	V_{FO} (mL)	V_{H_2O} (mL)	V_T (mL)	R_1	R_2	V_T (mL)	R_1	R_2
1	8,00	0,00	8,00	4,00	12,00	0,00	0,67	+	-	+
2	7,00	1,00	8,00	4,00	12,00	0,13	0,67	+	+	+
3	6,00	0,00	6,00	3,00	9,00	0,00	0,67	-	-	+
4	5,35	0,75	6,00	3,00	9,00	0,13	0,67	-	+	+
5	6,00	0,00	6,00	6,00	12,00	0,00	0,50	+	-	-
6	5,25	0,75	6,00	6,00	12,00	0,13	0,50	+	+	-
7	4,50	0,00	4,50	4,50	9,00	0,00	0,50	-	-	-
8	3,94	0,56	4,50	4,50	9,00	0,13	0,50	-	+	-
9	5,75	0,38	6,13	4,38	10,50	0,063	0,58	0	0	0

3.4.2 Otimização da etapa LDS/DLLME

A técnica LDS/DLLME foi otimizada para amostras de água, conforme relatado no capítulo 1, itens 4.1.1 a 4.1.5. As condições otimizadas foram: solvente extrator tolueno (80 μ L), modo de agitação em vortex, velocidade 8 do vortex, tempo de agitação de 60 segundos, volume de água de 5 mL e 400 μ L de acetonitrila como solvente dispersor. Nesta etapa de otimização, será verificada apenas a substituição do solvente dispersor (acetonitrila) pelo extrato de base acetonitrila obtido na etapa SLE/LTP, para amostras de solo.

3.4.2.1 Efeito do volume do extrato SLE/LTP obtido do solo

Nesta etapa será verificada a existência de diferenças na utilização de volumes variados de extrato SLE/LTP, em relação às respostas cromatográficas dos analitos. As condições da etapa LDS/DLLME serão mantidas, exceto o solvente dispersor e seu volume definido que serão substituídos pelo extrato base acetonitrila, obtido na etapa SLE/LTP. Os volumes de extrato testados serão 1,0 mL e 1,5 mL.

3.5 Validação da técnica de extração SLE/LTP - LDS/DLLME

No processo de validação do método otimizado foram avaliadas as figuras de mérito seletividade, linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão e exatidão. O processo de validação será realizada buscando atender aos critérios recomendados pelos principais órgãos regulamentadores, tais quais a ANVISA (ANVISA, 2003), INMETRO (INMETRO, 2007) e pelo Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica (MAPA, 2011).

3.5.1 Seletividade

A seletividade do método analítico foi avaliada comparando-se cromatogramas dos extratos da matriz isenta dos agrotóxicos (extrato em branco), com cromatogramas dos extratos da matriz fortificados com os agrotóxicos de interesse. Essa figura de mérito permite avaliar a inexistência de picos sobrepostos ou interferentes nos tempos de retenção dos compostos avaliados no extrato da matriz, bem como a separação dos picos de interesse.

3.5.2 Limite de detecção e limite de quantificação do método

Os limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) dos agrotóxicos avaliados neste trabalho foram calculados com base nos parâmetros das curvas analíticas de cada analito. O LOD e LOQ são definidos pela aplicação das equações (1) e (2).

$$\text{LOD} = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{s}{S} \quad (2)$$

Onde o parâmetro s é a estimativa do desvio padrão da equação do modelo de regressão e o parâmetro S representa a inclinação da curva analítica. As curvas analíticas tiveram no mínimo 5 níveis de concentrações diferentes, em triplicata.

3.5.3 Linearidade do método

A linearidade do método foi determinada pela injeção de extratos de amostras fortificadas em 6 concentrações crescentes, submetidas à técnica de extração otimizada. Os pontos iniciais das curvas analíticas foram coincidentes com o LOQ de cada agrotóxico avaliado, calculado anteriormente. A qualidade do ajuste do modelo de regressão foi avaliada pelo coeficiente de correlação e pela análise do gráfico de resíduos.

3.5.4 Exatidão

Para a avaliação da exatidão do método SLE/LTP - LDS/DLLME proposto foram realizados ensaios de recuperação. Nestes ensaios, as amostras de solo foram fortificadas em concentrações equivalentes a 1LQ, 2LQ e 4LQ, para cada agrotóxico, exceto parationa-metílica cujas concentrações foram 1,6LQ, 3,3LQ e 6,6LQ e submetidas ao procedimento de extração, em triplicata. A recuperação foi avaliada, para 3 dias não-consecutivos.

3.5.5 Precisão

A precisão do método foi avaliada pelo estudo da repetitividade e da precisão intermediária. O procedimento realizado é o mesmo para a avaliação da exatidão, porém, foi avaliado o coeficiente de variação da média das réplicas ao invés da recuperação.

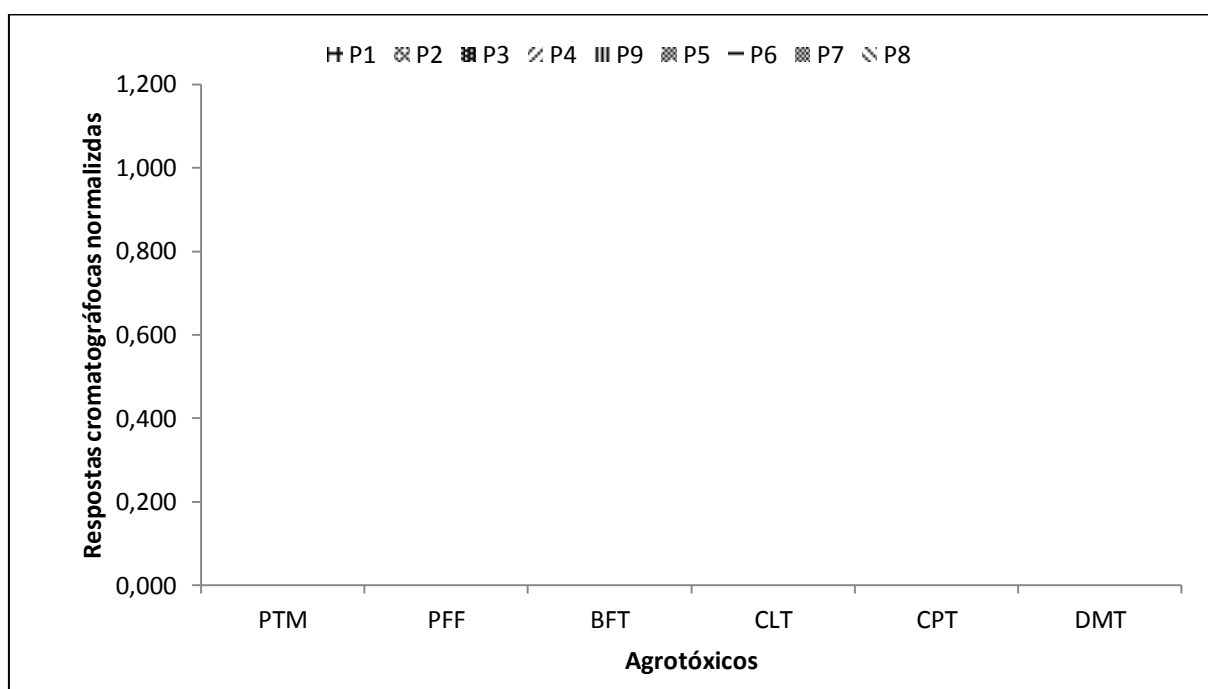
3.5.5.1 Repetitividade e Precisão intermediária

A repetitividade foi avaliada pela injeção e análise no mesmo dia de 3 extratos de amostras de água fortificadas com os seis agrotóxicos, em três níveis de concentração diferentes, conforme descrito para o processo de verificação da exatidão e submetidos à técnica de extração otimizada. O parâmetro a ser avaliado é o coeficiente de variação das médias das réplicas em um único dia, enquanto a precisão intermediária avaliará as médias de 3 dias não-consecutivos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização do Método de Extração SLE/LTP

A otimização da etapa da técnica SLE/LTP foi realizada de acordo com o planejamento fatorial 2^3 relatado na Tabela 14. Na Figura 13 estão representados os dados das áreas cromatográficas normalizadas atribuídas aos agrotóxicos, após extração pela técnica SLE/LTP, em amostras de solo fortificadas com concentração de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ de agrotóxicos.



PTM: Parationa-metilica; CPF: Clorpirifós; PFF: Profenofós; BFT: Bifentrina; CLT: λ -cialotrina; PMT: Permetrina; CPT: Cipermetrina; DMT: Deltametrina. P1 a P9: Ensaios realizados conforme planejamento fatorial descrito na Tabela 14.

Figura 13: Áreas das respostas cromatográficas dos analitos para extratos obtidos pela técnica SLE/LTP nos ensaios do planejamento fatorial 2^3 com ponto central para os fatores V_t , R_1 e R_2 .

Os resultados das respostas cromatográficas foram avaliados pelo teste ANOVA e foram obtidos os diagramas de Pareto para cada agrotóxico. A Tabela 15 contém os resultados dos efeitos para os agrotóxicos, dos fatores avaliados na otimização da etapa SLE/LTP. Em negrito, destacam-se os efeitos significativos.

Dos 6 agrotóxicos utilizados, 5 apresentaram efeito significativo negativo para o parâmetro R_2 (razão do volume da fase orgânica pelo volume total da mistura extratora). O agrotóxico que não apresentou efeito significativo para o parâmetro R_2

foi a lambda-cialotrina. Para o parâmetro V_t (volume total da mistura extratora), apenas os agrotóxicos bifentrina e cipermetrina apresentaram efeito significativo negativo, indicando que o menor volume de solução extratora seria o mais efetivo para esses dois agrotóxicos, enquanto que, os outros agrotóxicos não apresentaram nenhum efeito significativo para este parâmetro. O parâmetro R_1 (razão do volume de acetato de etila pelo volume da fase orgânica) influenciou a resposta significativamente apenas para cipermetrina, sendo que para os outros agrotóxicos este fator não foi significativo. E apenas cipermetrina apresentou interação secundária entre o volume de solução extratora e a composição da solução extratora. Para os demais agrotóxicos, não ocorreram interações secundárias para nenhum deles.

Tabela 15 - Efeitos significativos obtidos no planejamento fatorial 2^3 com ponto central para cada analito, na técnica SLE/ LTP.

Fatores	Parationa	Profenofós	Bifentrina	λ -cialotrina	Cipermetrina	Deltametrina
(1) R_1	- 1,14	- 0,18	0,74	- 0,32	3,07	1,05
(2) V_t	- 2,70	- 2,15	- 3,52	- 0,34	- 4,50	- 2,68
(3) R_2	- 6,78	- 3,29	- 4,11	- 1,30	- 6,50	- 5,14
(1) x (2)	1,65	1,92	- 0,73	-1, 05	3,32	0,003
(1) x (3)	1,93	0,01	- 1,59	- 0,02	- 2,05	- 0,39
(2) x (3)	2,64	0,93	2,22	0,02	2,90	1,09

(1) R_1 : razão do volume de acetato de etila pelo volume da fase orgânica); (2) V_t : Volume total da mistura extratora; (3) R_2 : razão do volume da fase orgânica pelo volume total da mistura extratora.

(1) x (2), (1) x (3) e (2) x (3): Interações entre os fatores avaliados.

Os valores não apresentados não foram significativos (ao nível de 95% de confiança).

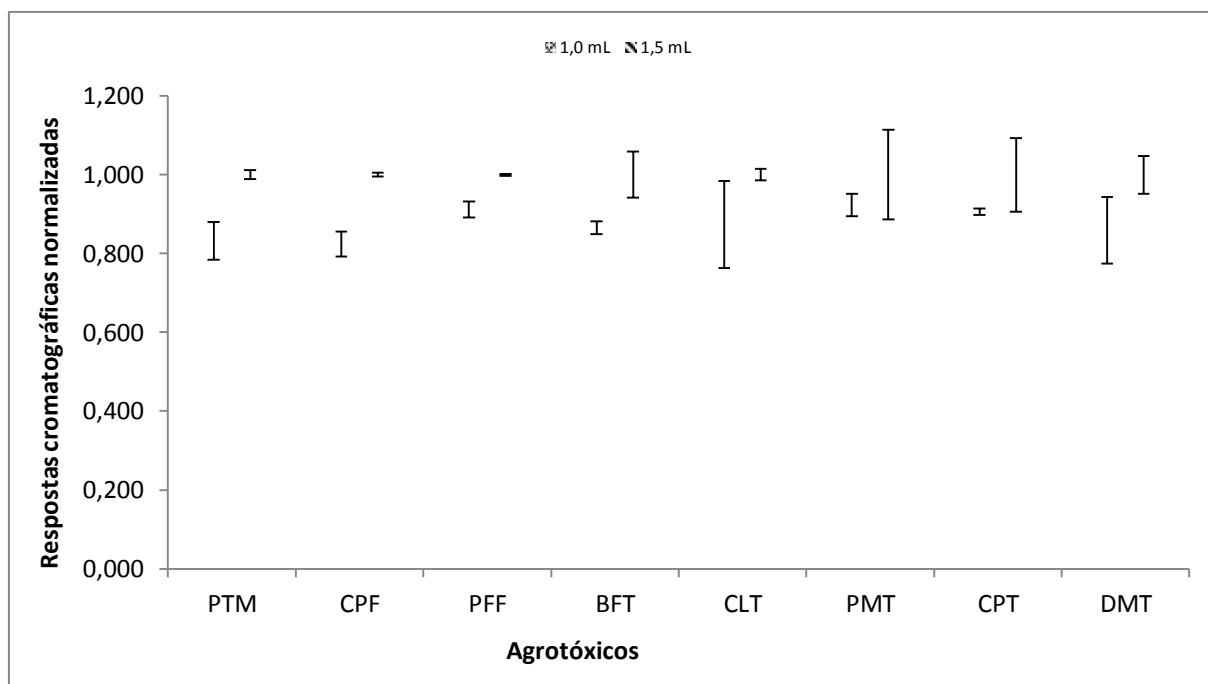
Com base nos resultados obtidos na otimização realizada, através do planejamento fatorial 2^3 , podemos concluir que as melhores condições de extração pela técnica SLE/LTP combina o menor volume total da mistura extratora, com a menor razão entre o volume da fase orgânica e o volume da mistura extratora, sendo que a presença de acetato de etila não é significativa. Dessa forma, será utilizada as seguintes condições nos estudos seguintes: A 2,0 gramas de solo são adicionados 4,5 mL de acetonitrila e 4,5 mL de água; agita-se por 1 minuto em vortex (vel. 6) e leva-se ao freezer (-20 °C) por 6 h. Após esse período, obtem-se 2,5 mL de extrato em acetonitrila que será utilizado na etapa LDS/DLLME.

4.2 OTIMIZAÇÃO DA ETAPA DE EXTRAÇÃO LDS/DLLME

A técnica LDS/DLLME foi otimizada para amostras de água, conforme relatado no capítulo 1, itens 4.1.1 a 4.1.5. As condições otimizadas utilizadas nesta etapa foram: solvente extrator tolueno (80 μ L), modo de agitação em vortex, velocidade 8 do vortex, tempo de agitação de 60 segundos, volume de água de 5 mL. Dessa forma, a única etapa de otimização da técnica LDS/DLLME para a determinação de agrotóxicos em solo foi a verificação da aplicação da técnica LDS/DLLME no extrato obtido na etapa SLE/LTP.

4.2.1 Efeito do volume do extrato obtido na etapa SLE/LTP para o solo

Devido às características da microtécnica LDS/DLLME, que utiliza microvolumes de solvente extrator, a aplicação direta em amostras de solo se torna inviável, pois a amostra tenderá a absorver o solvente extrator. Dessa forma é necessária uma etapa de extração prévia, que no caso desse trabalho, é a etapa SLE/LTP, otimizada previamente. Porém, no processo de hifenação das duas técnicas (SLE/LTP e LDS/DLLME), uma vez que o tolueno possui elevada solubilidade no extrato obtido na SLE/LTP, cuja base é acetonitrila, não é possível a aplicação direta da microtécnica no extrato obtido. Então, a solução encontrada foi o uso desse extrato obtido na SLE/LTP em substituição ao solvente dispensor da LDS/DLLME, sendo que a água foi utilizada para separar a acetonitrila do tolueno, em um processo que pode ser chamado de DLLME reversa. Mantendo-se as condições definidas no processo de otimização da etapa LDS/DLLME em água, substituiu-se o solvente extrator (acetonitrila) pelo extrato em acetonitrila obtido na etapa SLE/LTP, e, verificou-se os efeitos da variação do volume de solvente dispensor a ser usado. O efeito do volume do solvente dispensor foi avaliado em dois níveis (1,0 mL e 1,5 mL de extrato orgânico em acetonitrila). Os maiores valores de área obtidos foram para o uso de 1,5 mL de extrato orgânico, porém, a relação entre as áreas obtidas e os volumes utilizados não foram proporcionais (Figura 14). Para um aumento de 50 % no volume, obteve-se uma área 20 % maior para o agrotóxico parationa-metílico. Para os demais agrotóxicos, essa diferença foi menor ainda. Assim, optou-se pelo uso de um volume de extrato de 1,0 mL, visando a possibilidade de realização de replicatas do processo utilizando o mesmo extrato.



PTM: Parationa-metilica; CPF: Clorpirifós; PFF: Profenofós; BFT: Bifentrina; CLT: λ-cialotrina; PMT: Permetrina; CPT: Cipermetrina; DMT: Deltametrina.

Figura 14: Respostas cromatográficas dos analitos para variação de volumes do extrato orgânico obtido na etapa de extração SLE/LTP, aplicado como solvente dispersor na etapa LDS/DLLME.

Os resultados otimizados para o processo de extração hifenado SLE/LTP – LDS/DLLME encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16 - Condições otimizadas e validadas do processo de extração SLE/LTP - LDS/DLLME.

SLE/LTP		LDS/DLLME	
Variáveis	Quantidades	Variáveis	Quantidades
Massa de amostra	2 g	Volume água	5 mL
Mistura Extratora	Acetonitrila / H ₂ O	Solvente dispersor	Extrato SLE/LTP
Volume mistura extratora	9 mL	Volume de Solvente Dispersor	1000 µL
Volume fase Organica	4,5 mL	Solvente extrator	Tolueno
Volume H ₂ O	4,5 mL	Volume de Solvente Extrator	80 µL
Tempo de agitação	1 minuto / vortex, vel. 6	Modo de agitação	Vortex / vel. 8
Tempo de congelamento	6 h	Tempo de extração	60 segundos
Volume extrato	2,5 mL	Tempo e velocidade de centrifugação	5 minutos 3200 rpm
		Volume fase orgânica recolhida	50 µL

4.3 Validação da técnica SLE/LTP-LDS/DLLME aplicada ao solo

No processo de validação do método desenvolvido a partir da otimização da técnica SLE/LTP-LDS/DLLME foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: seletividade, linearidade e faixa de trabalho, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão e exatidão. Buscou-se neste trabalho, orientar-se pelos critérios estabelecidos pelos principais órgãos regulamentadores, como a ANVISA (ANVISA, 2003) e INMETRO (INMETRO, 2007). O processo de validação possui duas funções básicas: garantir o atendimento aos critérios de aceitação preconizados, através dos parâmetros de desempenho avaliados, garantindo a qualidade metrológica além de permitir a redução e o controle de fatores que podem levar a imprecisão ou inexatidão de um dado apresentado (MAPA, 2011). As condições a serem validadas estão descritas na Tabela 16.

A seletividade é dada pela capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa, e garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Para avaliar a SELETIVIDADE do método de extração foram injetados e comparados: extrato da amostra sem os agrotóxicos (branco) (A) e o extrato da amostra fortificada com os agrotóxicos (B).

Na Figura 15 estão representados dois cromatogramas, sendo um cromatograma (15A) de uma amostra sem agrotóxicos e um cromatograma (15B) de uma amostra fortificada com agrotóxicos em uma concentração equivalente a 4LQ, ambas submetidas ao processo de extração SLE/LTP-LDS/DLLME, conforme condições otimizadas na descritas na Tabela 16. Pode-se observar, que apesar da existência de picos no extrato da amostra isenta de agrotóxicos (extrato isento de agrotóxicos), a seletividade do método foi atendida.

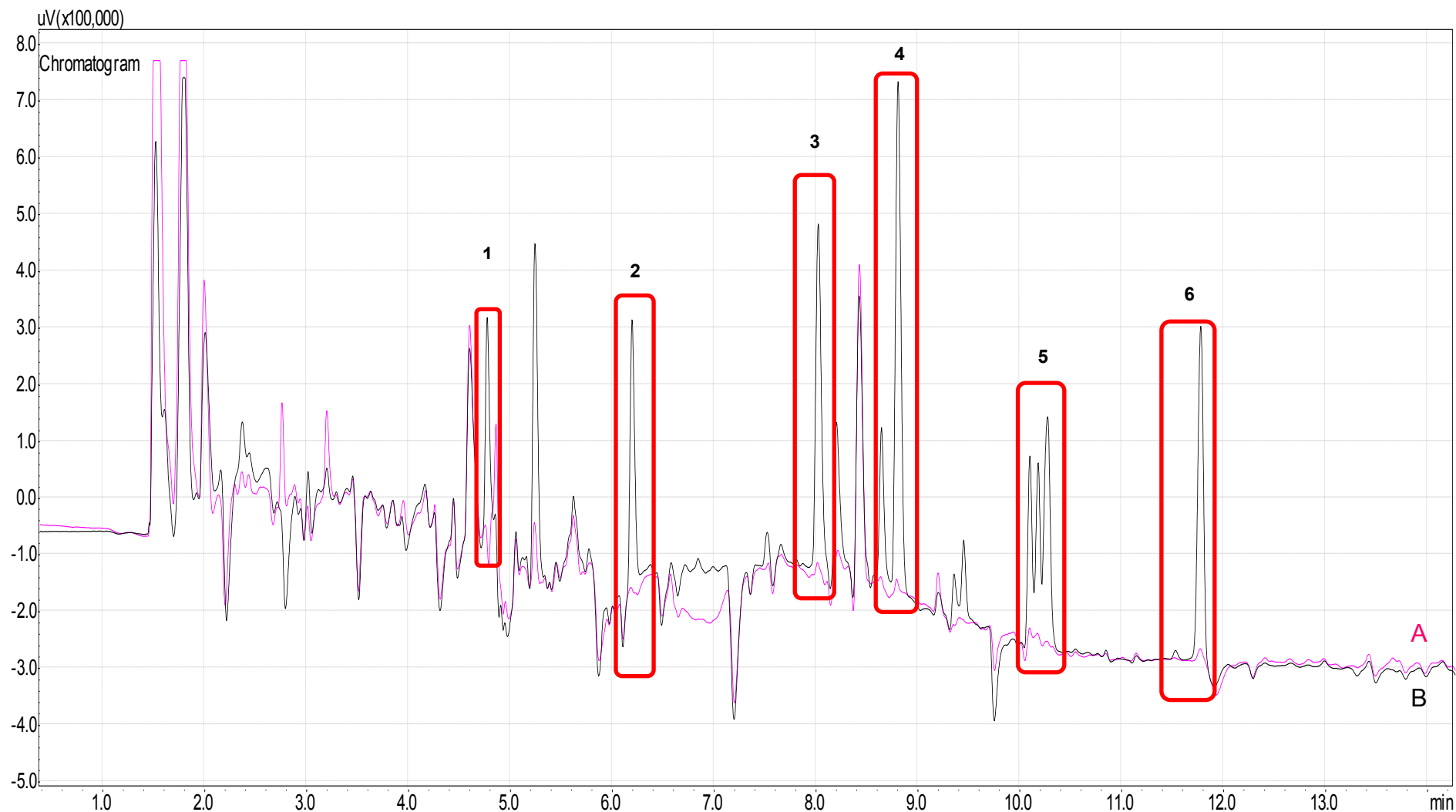


Figura 15: Cromatograma do extrato da amostra de solo isento de agrotóxicos (A) comparado com cromatograma do extrato da amostra de solo fortificada com padrões de agrotóxicos na concentração de 4LQ (B), após extração pelo método SLE/LTP – LDS/DLLME.

Analitos: 1: Parationa-metílica; 2: Profenofós; 3: Bifentrina; 4: λ -cialotrina; 5: Cipermetrina; 6: Deltametrina.

Condições cromatográficas: 150 °C (1 min); 30 °C/min; 210 °C (1 min); 30 °C/min; 250 °C (2 min); 20 °C/min; 290 °C (5 min); tempo de corrida de 14,3 min.

Para realizar o estudo de linearidade, foi construída uma curva analítica para cada agrotóxico de interesse, fortificando-se amostras da matriz estudada (solo) com quantidades adequadas das soluções-trabalho dos agrotóxicos. O estudo da linearidade foi realizado inicialmente injetando-se extratos SLE/LTP-LDS/DLLME de amostras fortificadas em 8 níveis de concentração. A faixa de concentração utilizada inicialmente foi de $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $60 \mu\text{g kg}^{-1}$, para parationa, profenofós, cipermetrina e deltametrina, e de $1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $120 \mu\text{g kg}^{-1}$, para bifentrina e λ -cialotrina. O ponto inicial da curva equivale ao limite de detecção estimado para cada agrotóxico, pela relação sinal-ruído. A partir das curvas analíticas obtidas para cada agrotóxico, calculou-se os LODs e LOQs, com base nos parâmetros das curvas analíticas e construiu-se nova curva analítica, com base nos LOQs calculados (Tabela 17). Para cada agrotóxico foram obtidas a faixa de trabalho e, as equações das curvas analíticas, que foram utilizadas para os ensaios de exatidão e precisão. Os valores de LOD e LOQ encontram-se na Tabela 17, assim como as respectivas equações de cada curva analítica construída, os intervalos de aplicação de cada agrotóxico, e seus respectivos coeficientes de correlação (r), além do fatores de enriquecimento (EF).

Tabela 17 - Valores de LOD, LOQ, Coeficiente de correlação, equação da Curva analítica e EF (fator de enriquecimento) para cada analito validado.

ANALITOS	PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO					
	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	FAIXA DE TRABALHO ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	EQUAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA	r	EF
Parationa ^a	1,0	3,0	3,0 – 60,0	$Y = -249,6x^2 + 41062,5x - 27662$	0,9986	4,88
Profenofós ^a	1,7	5,0	5,0 – 100,0	$Y = -223,9x^2 + 37458,4x + 1847$	0,9967	6,15
Bifentrina ^a	3,3	10,0	10,0 – 200,0	$Y = -22,7x^2 + 20363,0x + 31721$	0,9970	3,62
Cialotrina ^a	3,3	10,0	10,0 – 200,0	$Y = -25,4x^2 + 33549,1x - 94754$	0,9972	1,22
Cipermetrina ^b	2,3	7,0	7,0 – 140,0	$Y = 35136,2x + 971902$	0,9952	1,35
Deltametrina ^b	2,3	7,0	7,0 – 140,0	$Y = 23347,9x - 53692$	0,9964	5,12

a: equação quadrática e b: equação linear

Podemos observar que os valores obtidos para os coeficientes de correlação apresentam-se acima de 0,99, que é o valor recomendado pela ANVISA para métodos analíticos (ANVISA, 2003).

Também foram avaliados os gráficos de resíduos obtidos a partir dos valores calculados pela curva analítica de cada agrotóxico. Os valores normalizados para os resíduos foram obtidos calculando-se os valores a partir da equação obtida da curva analítica, dividindo esses valores calculados pelo valor do erro relativo ao termo y. Um exemplo de gráfico de resíduo normalizado é mostrado na Figura 16, para o agrotóxico parationa-metílica

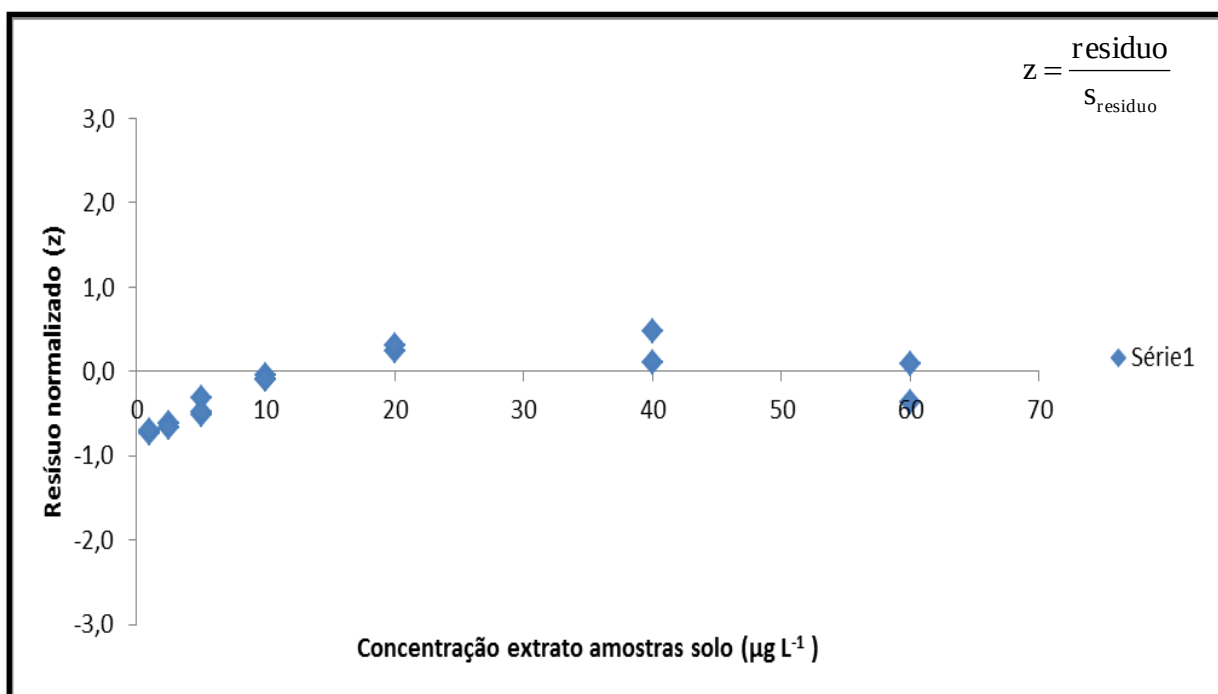


Figura 16: Gráfico de resíduos normalizados para a curva analítica da parationa-metílica em amostras de solo extraídas pelo método SLE/LTP - LDS/DLLME.

Os gráficos de resíduos para os demais agrotóxicos seguiram a mesma característica, não apresentando nenhuma tendência.

Para os ensaios de precisão e exatidão, utilizou-se 3 níveis de concentração, em triplicata equivalentes a 1LQ, 2LQ e 4LQ, para cada agrotóxico, exceto parationa-metílica cujas concentrações foram 1,6LQ, 3,3LQ e 6,6LQ e submetidas ao procedimento de extração, em triplicata. A repetitividade foi avaliada através das respostas cromatográficas dos extratos relacionadas com a curva analítica, injetada no mesmo dia que os extratos das amostras fortificadas, para cada agrotóxico.

Foram calculados os coeficientes de variação (CV) para as médias de cada nível de concentração, de cada agrotóxico. Os resultados para a repetibilidade se encontram na Tabela 18. Para os ensaios de repetibilidade em um único dia, os resultados de % recuperação para cada agrotóxico ficou de acordo com a faixa sugerida pelos organismos normativos, sendo este de 70 a 120 %, para parationa-metílica, bifentrina, λ -cialotrina, e deltametrina. Profenofós (1LQ) e cipermetrina (2LQ e 4LQ) apresentaram recuperação de 123, 123 e 121,2 % respectivamente. Os coeficientes de variação também se apresentaram dentro da faixa esperada, para o nível de concentração utilizado no trabalho, que seria de 20% de variação, exceto para deltametrina (1LQ), cujo coeficiente de variação foi de 35,8%

Para o ensaio de precisão intermediária, realizou-se o mesmo procedimento realizado para os ensaios de repetitividade, porém em mais dois dias alternados, já que o ensaio de repetitividade atende ao ensaio de precisão interna, no primeiro dia. A Tabela 19 apresenta os resultados da precisão intermediária para média das concentrações e média da recuperação em 3 dias. Para as concentrações utilizadas neste trabalho, o limite de CV é 35 %, sendo que todos agrotóxicos em todos os níveis avaliados apresentaram valores de CV abaixo desse valor limite. A recuperação dos agrotóxicos nos 3 níveis de concentração permaneceu dentro da faixa sugerida pelos organismos acreditadores, que é de 70 a 120 %. Os valores para os fatores de enriquecimento (EF) estão na mesma ordem de grandeza de outros trabalhos realizados com solo, como por exemplo o trabalho de Salemi *et al.*,(2013), que analisou alguns organofosforados, entre eles a parationa, obtendo fator de enriquecimento (EF) de 1,7, aplicando a técnica SDME por Headspace (SALEMI *et al.*, 2013). Dessa forma o método SLE/LTP – LDS/DLLME foi validado e considerado aceitável para determinação de resíduos de agrotóxicos em solos.

Os fatores de enriquecimento dos agrotóxicos nas amostras de solos apresentaram valores bem menores do que nas amostras de água. Isso ocorre porque nas amostras de água, a extração ocorre em toda a massa de analito que se encontra na amostra, enquanto que nas amostras de solo, só é utilizada na etapa LDS/DLLME, aproximadamente 20% da massa de analito existente na amostra de solo.

A Figura 17 representa o esquema da aplicação da metodologia de análise SLE/LTP-LDS/DLLME para amostras de solo.

TABELA 18 - Valores de repetitividade e porcentagem de recuperação do método de análise proposto – 1º dia

ANALITOS	REPETITIVIDADE 1º DIA (N=3)					
	Concentração Nominal ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Nível de Concentração LOQ	Média Concentração ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	/ Recuperação Média	Desvio Padrão Recuperação	CV (RSD /)
PARATIONA	5,0	1,6 LOQ	4,81	96,2	12,98	13,40
	10,0	3,3 LOQ	10,36	103,6	2,56	2,47
	20,0	6,6 LOQ	20,09	100,5	0,68	0,68
PROFENOFÓS	5,0	1,0 LOQ	6,15	123,0	19,92	16,2
	10,0	2,0 LOQ	9,95	99,5	13,27	13,3
	20,0	4,0 LOQ	20,21	101,1	4,89	4,8
BIFENTRINA	10,0	1,0 LOQ	9,78	97,8	12,15	12,4
	20,0	2,0 LOQ	20,78	103,9	2,43	2,3
	40,0	4,0 LOQ	41,34	103,4	2,97	2,9
CIALOTRINA	10,0	1,0 LOQ	9,66	96,6	2,20	2,3
	20,0	2,0 LOQ	17,08	85,4	9,19	10,8
	40,0	4,0 LOQ	44,07	110,2	0,38	0,3
CIPERMETRINA	7,0	1,0 LOQ	5,83	83,3	2,6	3,2
	14,0	2,0 LOQ	17,22	123,0	10,9	8,9
	28,0	4,0 LOQ	33,92	121,2	5,4	4,5
DELTAMETRINA	8,0	1,0 LOQ	5,68	71,0	25,38	35,8
	16,0	2,0 LOQ	15,37	96,0	19,21	20,0
	32,0	4,0 LOQ	28,34	88,6	10,38	11,7

TABELA 19 - Valores de precisão intermediária do método ao longo de 3 dias para os analitos validados

ANALITOS	PRECISÃO INTERMEDIÁRIA - Média 3 dias (n=3)					
	Concentração Nominal ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Nível de Concentração LOQ	Média Concentração ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	RSD / Concentração	Média / Recuperação	CV (RSD /) Recuperação
PARATIONA	5,0	1,6 LOQ	5,43	14,5	105,4	14,5
	10,0	3,3 LOQ	10,52	7,8	104,5	7,8
	20,0	6,6 LOQ	20,04	6,4	100,9	6,4
PROFENOFÓS	5,0	1,0 LOQ	5,60	14,8	112,1	14,8
	10,0	2,0 LOQ	11,03	12,5	110,3	12,5
	20,0	4,0 LOQ	19,99	8,1	99,9	8,1
BIFENTRINA	10,0	1,0 LOQ	9,73	9,0	97,3	9,0
	20,0	2,0 LOQ	20,50	12,0	102,5	12,0
	40,0	4,0 LOQ	39,26	5,6	98,1	5,6
CIALOTRINA	10,0	1,0 LOQ	8,50	17,01	85,0	17,01
	20,0	2,0 LOQ	17,52	15,38	87,6	15,38
	40,0	4,0 LOQ	35,52	20,90	88,8	20,90
CIPERMETRINA	7,0	1,0 LOQ	7,17	16,0	102,5	16,0
	14,0	2,0 LOQ	14,55	21,7	103,9	21,7
	28,0	4,0 LOQ	28,01	18,4	100,0	18,4
DELTAMETRINA	8,0	1,0 LOQ	6,49	21,9	82,1	21,9
	16,0	2,0 LOQ	14,25	19,2	89,1	19,2
	32,0	4,0 LOQ	23,29	24,6	72,8	24,6

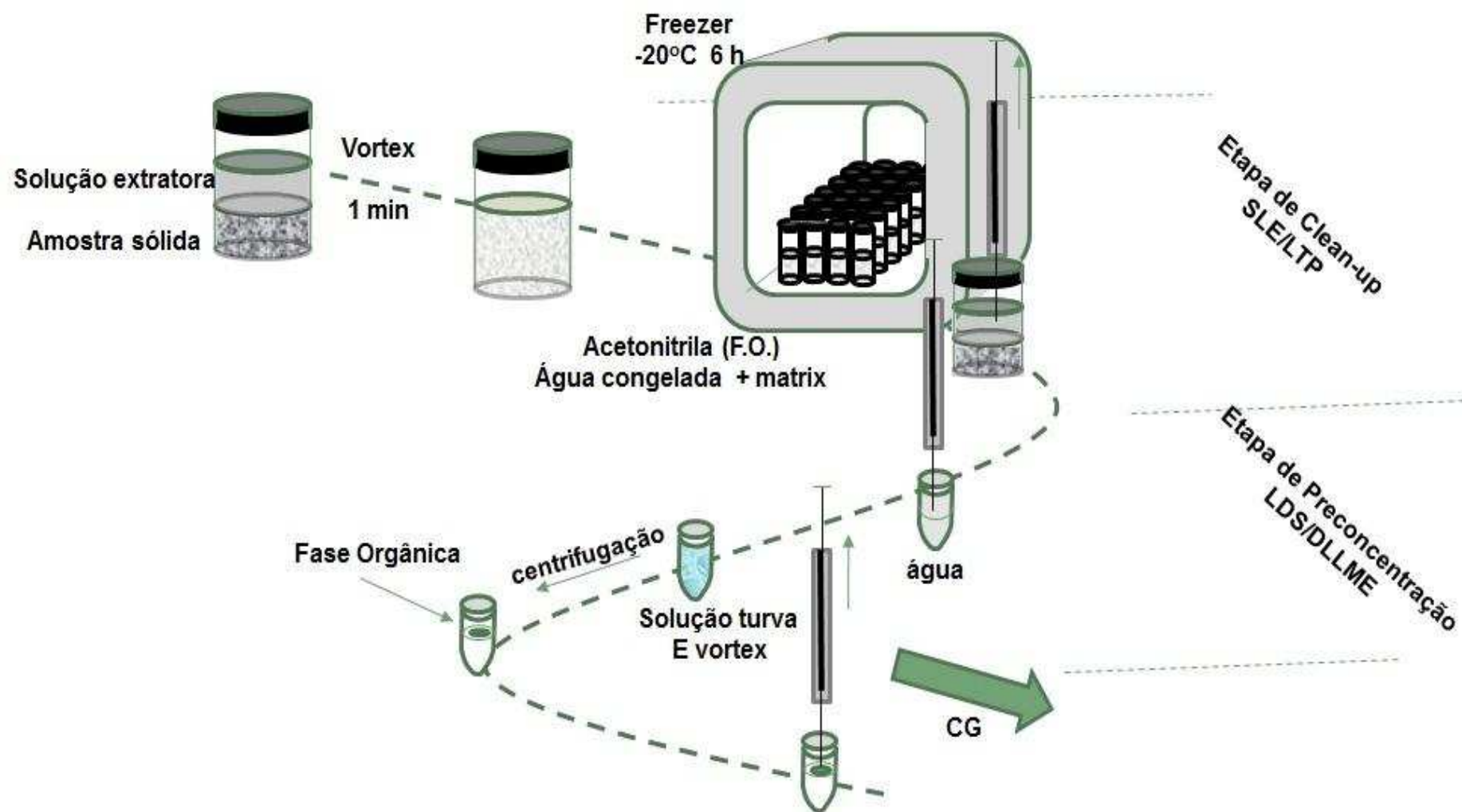


Figura 17: Esquema da aplicação da metodologia de análise SLE/LTP-LDS/DLLME para amostras de solo.

5. APLICAÇÃO EM SOLOS AGRÍCOLAS

O novo método de extração foi aplicado em amostras de solos coletados em duas regiões distintas. O solo 1 foi obtido de uma região do município de Tangará da Serra – MT e o solo 2 foi obtido de um campo experimental da Universidade Federal de Viçosa. Os dois solos são diferentes do solo utilizado na etapa de otimização e validação do método aplicado. A Tabela 20 contém algumas características de cada solo. As amostras foram preparadas da mesma forma que preparou-se o solo relatado no item 3.3.1.

Tabela 20: Análise textural dos solos utilizados na aplicação do método hifenado

Origem	pH ^a	% Matéria Orgânica	% Silte	% Argila	% Areia
Solo 1 Tangará da Serra - MT	5,71	3,23	16,0	58,0	26,0
Solo 2 Viçosa – MG	5,20	3,30	14,0	54,0	32,0

a: pH em solução de KCl 0,1 mol.L⁻¹;

As amostras de solo não mostraram contaminação pelos agrotóxicos de interesse. Em função disso o método hifenado foi aplicado nos dois solos após fortificação dos mesmos em três níveis de concentração, em triplicatas. O solo 1 foi utilizado no preparo da curva analítica pela adição de padrões dos agrotóxicos com 5 pontos, em triplicatas. As curvas analíticas obtidas para todos os agrotóxicos polinomiais quadráticas, com valores de r entre 0,986 a 0,997. Os níveis de fortificação foram de 20, 33,3 e 66,6% da faixa de trabalho definida na Tabela 17. A partir das curvas analíticas obtidas, calculou-se a concentração experimental, a recuperação e o coeficiente de variação ($n=4$) para cada nível, em cada solo avaliado. Os resultados obtidos para os dois solos encontram-se na Tabela 21.

Como era de se esperar, os resultados de porcentagem de recuperação obtidos para o solo 1 são bastante próximos de 100% uma vez que esse solo foi utilizado na construção da curva analítica. A repetitividade avaliada pelo coeficiente de variação mostrou que o método é reprodutivo apesar das duas etapas do processo de hifenação.

Para o solo 2 observa-se resultados com porcentagem de recuperação acima de 100%, devido a um possível efeito de matriz. Embora as duas amostras de solo

tenham características gerais similares (Tabela 20), são matrizes complexas com inúmeras variáveis que podem influenciar os resultados.

Tabela 21: Concentração e % de recuperação dos analitos nos solos submetidos ao processo de extração SLE/LTP-LDS/DLLME

	Solo 1 (n=4)			Solo 2 (n=4)		
	Nível Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CV %	% Recovery	Nível Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	% CV	% Recovery
PTM	12,0	8,9	99,8	16,1	11,5	134,3
	19,9	1,9	99,7	23,7	8,4	118,3
	40,0	7,3	100,1	43,4	8,2	108,4
PFF	19,9	11,7	99,4	24,9	5,5	124,4
	33,1	2,4	99,3	47,7	13,2	143,3
	66,4	5,8	99,5	98,0	20,1	147,0
BFT	40,0	6,3	99,9	53,1	7,5	132,8
	65,4	3,4	98,0	98,1	20,5	120,3
	140,1	1,3	105,8	208,3	13	156,3
CLT	40,5	13,2	101,2	66,7	9,7	166,8
	69,1	1,9	102,7	91,2	9,3	136,8
	134,3	7,8	100,7	147,5	6,6	110,6
CPT	32,0	14,7	114,3	32,1	9,0	117,2
	49,1	5,9	105,3	63,4	4,9	135,9
	97,9	2,2	104,9	161,9	4,1	173,5
DMT	32,0	20,1	114,2	33,9	8,5	121,0
	54,4	10,8	116,5	54,2	6,9	116,2
	109,9	4,6	117,7	134,6	1,4	144,2

Com os resultados de concentração obtidos (Tabela 21) construiu-se gráficos de comparação entre os dois solos, onde podemos observar o comportamento do método para cada analito, nas amostras analisadas, referente à cada solo.

Para os organofosforados parationa-metílico (Figura 18) e profenofós (Figura 19) observamos que o solo 1 (Tangará da serra, MT), no qual foi preparado a curva analítica aplicando-se a técnica de adição de padrão, responde conforme o esperado, apresentando uma recuperação bem próxima a 100%. O solo 2 (campo de feijão, Viçosa-MG) apresenta maior % de recuperação com valores acima de 100%, se afastando dos valores teóricos das concentrações utilizadas na fortificação das amostras. O comportamento dos piretróides é um pouco diferente, pois os mesmos apresentam um leve desvio das concentrações obtidas, para a concentração teórica. A bifentrina (Figura 20) e a lambda cialotrina (Figura 21) apresentam esse leve deslocamento, enquanto que a cipermetrina (Figura 22) e a deltametrina (Figura 23) já apresentam valores de desvio mais acentuados. Conclui-

se que é necessário, para o caso de matrizes complexas, a preparação de uma curva na matriz, com adição de padrão, a ser analisada, para suprimir esses desvios.

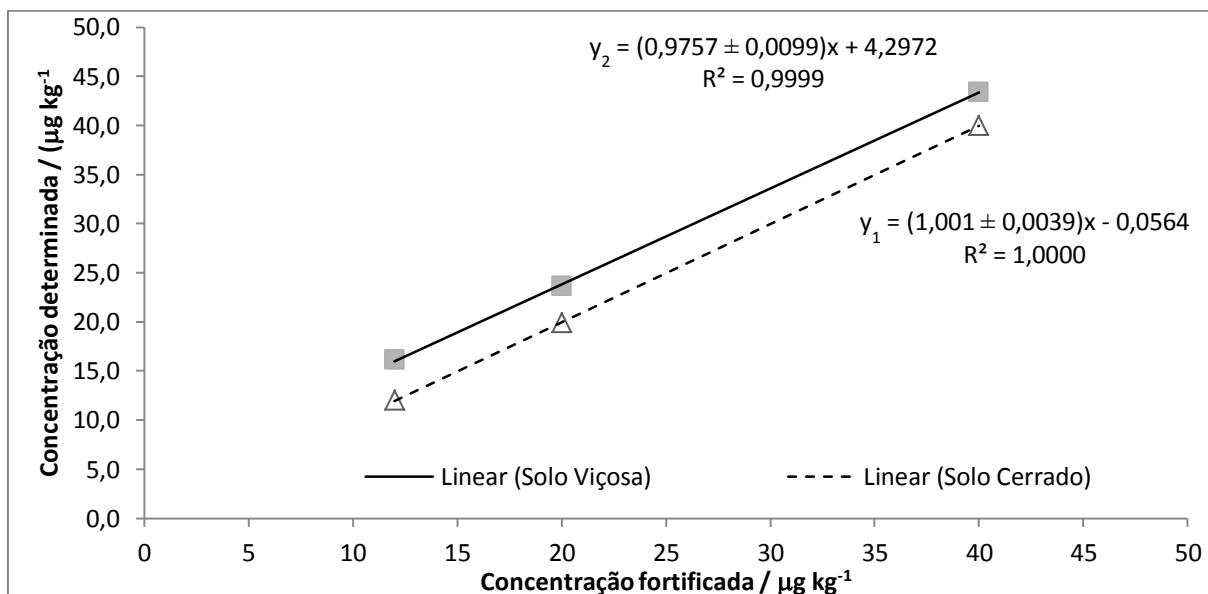


Figura 18: Comparação entre duas amostras de solos distintos, em três níveis de concentração, para o agrotóxico parationa metílica. y_1 : equação da reta para o solo viçosa; y_2 : equação da reta para o solo cerrado.

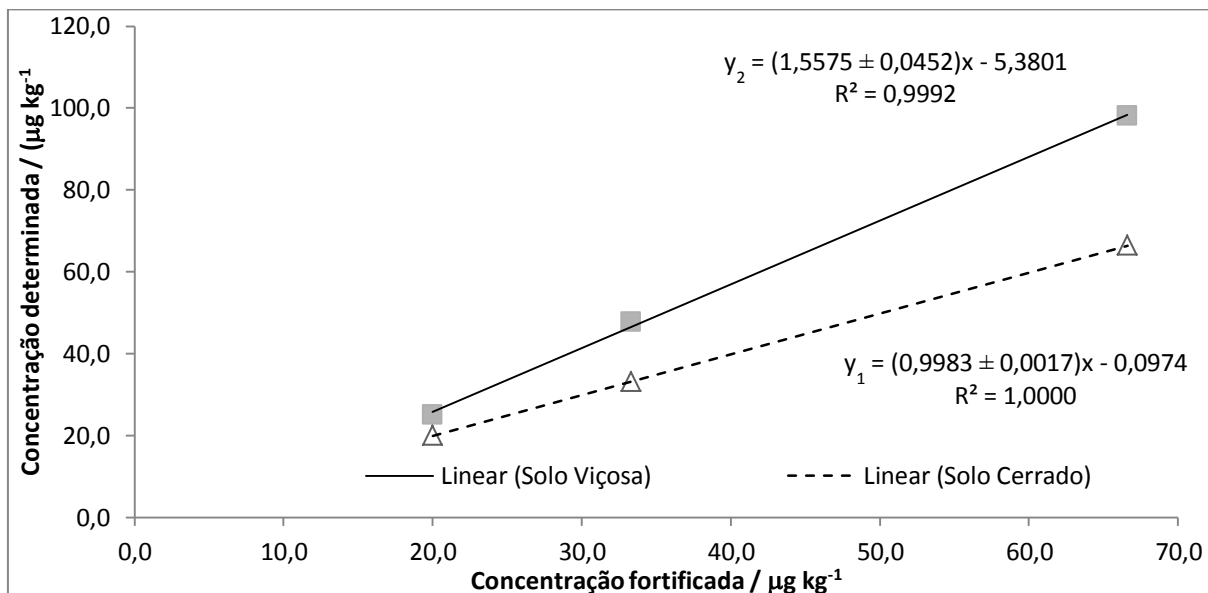


Figura 19: Comparação entre duas amostras de solos distintos, em três níveis de concentração, para o agrotóxico profenofós. y_1 : equação da reta para o solo viçosa; y_2 : equação da reta para o solo cerrado.

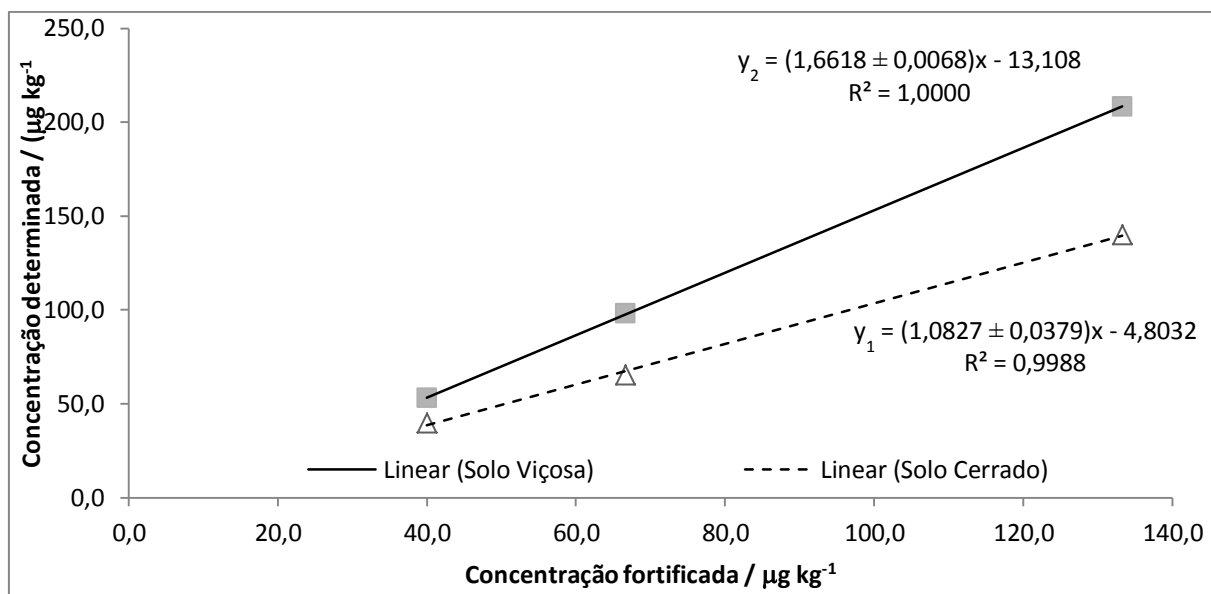


Figura 20: Comparação entre duas amostras de solos distintos, em três níveis de concentração, para o agrotóxico bifentrina. y_1 : equação da reta para o solo viçosa; y_2 : equação da reta para o solo cerrado.

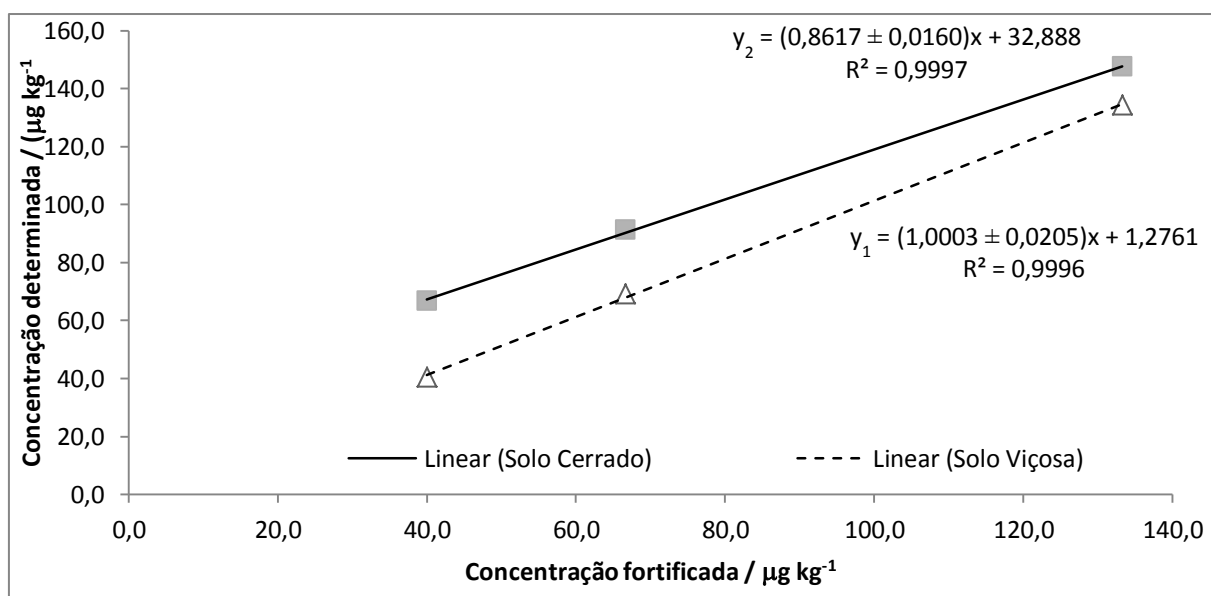


Figura 21: Comparação entre duas amostras de solos distintos, em três níveis de concentração, para o agrotóxico lambda-cialotrina. y_1 : equação da reta para o solo viçosa; y_2 : equação da reta para o solo cerrado.

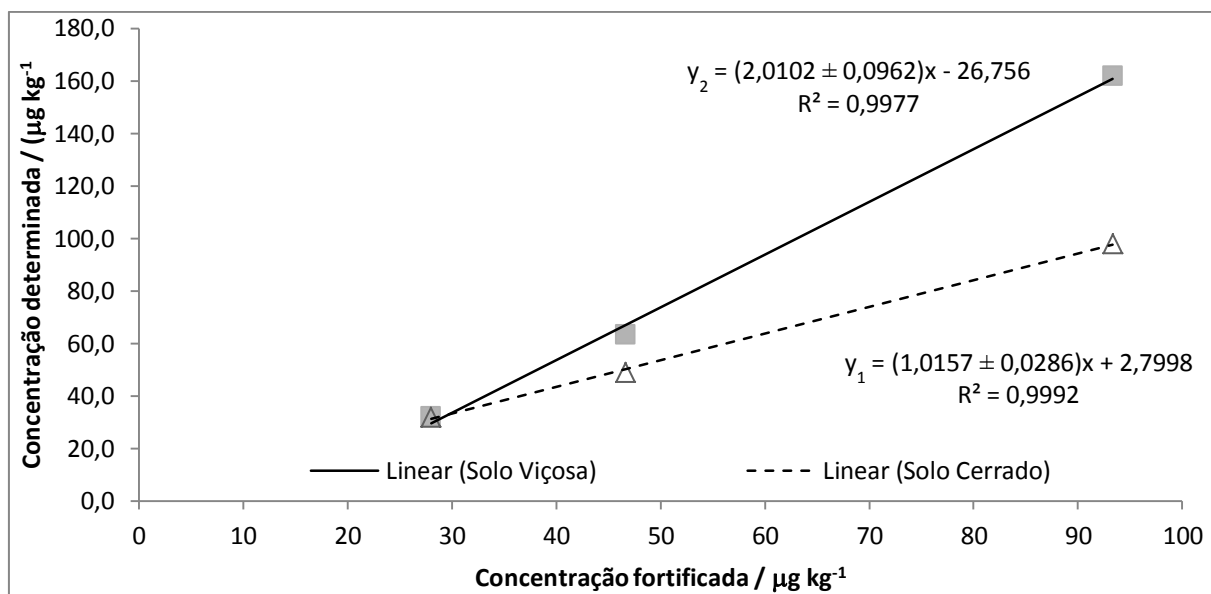


Figura 22: Comparação entre duas amostras de solos distintos, em três níveis de concentração, para o agrotóxico cipermetrina. y_1 : equação da reta para o solo viçosa; y_2 : equação da reta para o solo cerrado.

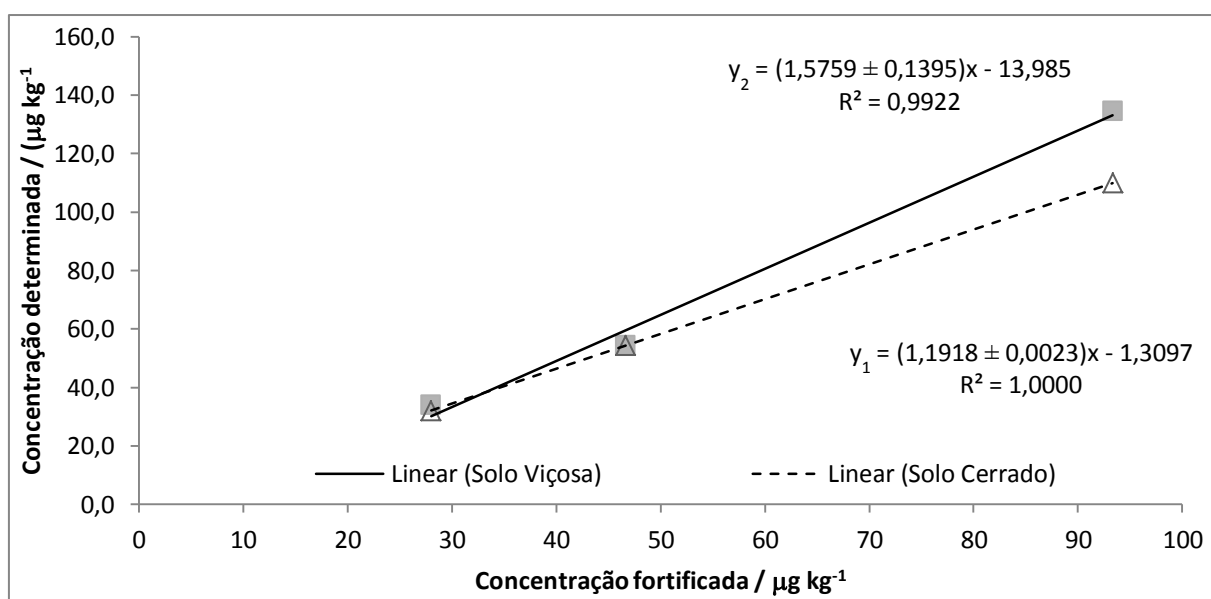


Figura 23: Comparação entre duas amostras de solos distintos, em três níveis de concentração, para o agrotóxico deltametrina. y_1 : equação da reta para o solo viçosa; y_2 : equação da reta para o solo cerrado.

6. CONCLUSÕES

O método SLE/LTP – LDS/DLLME foi otimizado e validado, e se mostrou seletivo, linear, preciso e exato, sendo, portanto uma nova alternativa de extração para ser aplicada na análise de agrotóxicos em amostras de solos. Ele associou as vantagens da SLE/LTP com as vantagens da LDS/DLLME, se mostrando uma ferramenta analítica poderosa, permitindo LODs na ordem de $\mu\text{g kg}^{-1}$, semelhante a vários trabalhos já publicados para determinação de organofosforados e piretróides em solos, por várias microtécnicas, além de ser prática, pois é de fácil aplicação e permite uma boa frequência analítica.

A análise de agrotóxicos em solos sofre efeito de matriz devido à composição complexa dos mesmos, que pode variar consideravelmente de um local para outro. Isso implica que deve-se utilizar sempre a técnica de adição de padrão na elaboração de uma curva analítica para amostras de solo.

O método SLE/LTP - LDS/DLLME, assim como as técnicas separadas SLE/LTP e LDS/DLLME são bastante promissoras, podendo ser testadas no modo hifenado em diversos tipos de amostras sólidas.

O uso miniaturizado de solventes permite economia e diminuição de riscos ambientais e operacionais, podendo ser enquadrado como uma metodologia analítica verde.

Estudos futuros para a aplicação da metodologia podem abordar o uso de surrogates para melhorar a análise dos dados cromatográficos, estudos de efeito de matriz em diversos tipos de solos e, aplicação em matrizes de alimentos, como frutaa, leite e carne. Estudos de avaliação econômica também podem ser realizados visando corroborar as premissas da química verde.

REFERÊNCIAS

- AHMADI, F.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, S. M. R. M.; REZAEI, M. Determination of organophosphorus pesticides in water samples by single drop microextraction and gas chromatography-flame photometric detector. **Journal of Chromatography A** 1101, 307-312, 2006.
- AKOTO, O.; ANDOH, H.; DARKO, G.; ESHUN, K.; OSEI-FOSU, P. Health risk assessment of pesticides residue in maize and cowpea from Ejura, Ghana. **Chemosphere** 92, 67-73, 2013.
- ALMEIDA, C.; FERNANDES, J.O.; CUNHA, S.C. A novel dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) gas chromatography- mass spectrometry (GC/MS) method for the determination of eighteen biogenic amines in beer. **Food Control** 25, 380-388, 2012.
- ANASTAS, P. T.; KIRCHHOFF, M. M. Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry. **Account of Chemical Research** 35, 686, 2002.
- ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; ŠTAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC International** 86, 2, 412-431, 2003.
- ANDRADE, S. R. B. Avaliação de sorção, dessorção, meia-vida e lixiviação do ametryn em argissolo vermelho-amarelo e latossolo vermelho-amarelo. 2008. 83f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, M.G, 2008.
- ANDREU, V.; PICÓ, Y. Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. **Trends in Analytical Chemistry** 23, 10-11, 772-789, 2004.
- ANDREU, V.; FERRER, E.; RUBIO, J.L.; FONT, G. PICÓ, Y. Quantitative determination of octylphenol, nonylphenol, alkylphenol ethoxylates and alcohol ethoxylates by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry in soils treated with sewage sludges. **Science of the Total Environment** 378, 124-129, 2007.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2 jun. 2003, seção1, p. 56-59.
- ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; LA GUARDIA, M. de. Green Analytical Chemistry. **Trends in Analytical Chemistry** 27, 6, 497-511, 2008.
- ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry** 62, 2145-2148, 1990.

ASENSIO-RAMOS, M.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; BORGES-MIQUEL, T. M.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. Ionic liquid-dispersive liquid–liquid microextraction for the simultaneous determination of pesticides and metabolites in soils using high-performance liquid chromatography and fluorescence detection **Journal of Chromatography A** 1218, 4808 – 4816, 2011.

BAIRD, C.; CANN, M. **Química Ambiental**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2011. 844 p.

BASHEER, C.; OBBARD, J. P.; LEE, H. K. Analysis of persistent organic pollutants in marine sediments using a novel microwave assisted solvent extraction and liquid-phase microextraction technique. **Journal of Chromatography A** 1068, 221–228, 2005.

BERIJANI, S.; ASSADI, Y.; ANBIA, M.; MILANI HOSSEINI, M.-R.; AGHAEE, E. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection: Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water. **Journal of Chromatography A** 1123, 1-9, 2006.

BIPARVA, P.; EHSANI, M.; HADJMOHAMMADI, M. R. Dispersive liquid–liquid microextraction using extraction solvents lighter than water combined with high performance liquid chromatography for determination of synthetic antioxidants in fruit juice samples. **Journal of Food Composition and Analysis** 27, 87–94, 2012.

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

BOYD-BOLAND, A. A.; PAWLISZYN, J. B. Solid-phase microextraction of nitrogen-containing herbicides. **Journal of Chromatography A** 704, 163-172, 1995.

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

BRASIL. Resolução CONAMA nº 420, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. **Diário Oficial União**, Brasília, DF, 30 dez. 2009, p. 81.

BRASIL. Portaria MS Nº 2914 DE 12 de dezembro de 2011. *Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade*. **Diário Oficial da União** nº 239, de 14 de dezembro de 2011, Seção 1, p. 39.

CASTRO, J.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; TADEO, J. L. Multiresidue analysis of insecticides in soil by gas chromatography with electron–capture detection and confirmation by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** 918, 371–380, 2001.

CARVALHO, P. N.; RODRIGUES, P. N. R.; ALVES, F.; EVANGELISTA, R.; BASTO, M. C. P.; VASCONCELOS, M. T. S. D. An expeditious method for the determination of organochlorine pesticides residues in estuarine sediments using microwave assisted pre-extraction and automated headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry. **Talanta** 76 1124–1129, 2008.

CERTINI, G.; UGOLINI, F. C. An updated, expanded, universal definition of soil. **Geoderma** 192, 378–379, 2013.

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

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

CHEN, H.; CHEN, H.; YING, J.; HUANG, J.; LIAO, L. Dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for simultaneous determination of chloramphenicol and thiamphenicol in honey. **Analytica Chimica Acta** 632, 80–85, 2009.

CHEN, H.; CHEN, R.; LI, S. Low-density extraction solvent-based solvent terminated dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of carbamate pesticides in water samples. **Journal of Chromatography A** 1217, 1244-1248, 2010.

COLOMBINI, V.; BANCON-MONTIGNY, C.; YANG, L.; MAXWELL, P.; STURGEON, R.E.; MESTER, Z. Headspace single-drop microextraction for the detection of organotin compounds. **Talanta** 63, 555–560, 2004.

CUNHA, S.C.; FERNANDES, J.O. Multipesticide residue analysis in maize combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry **Journal of Chromatography A** 1218 7748– 7757, 2011.

CUNHA, S.C.; FERNANDES, J.O. Assessment of bisphenol A and bisphenol B in canned vegetables and fruits by gas chromatography-mass spectrometry after QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction. **Food Control** 33, 549-555, 2013.

DENG, C.; YAO, N.; WANG, B.; ZHANG, X. Development of microwave-assisted extraction followed by headspace single-drop microextraction for fast determination of paeonol in traditional Chinese medicines. **Journal of Chromatography A** 1103, 15–21, 2006.

DONG, S.; HU, Q.; YANG, Z.; LIU, R.; HUANG, G.; HUANG, T. An ionic liquid-based ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction procedure followed by HPLC for the determination of low concentration of phytocides in soil. **Microchemical Journal** 110, 221-236, 2013.

DOONG, R.; LIAO, P. Determination of organochlorine pesticides and their metabolites in soil samples using headspace solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, 918, 177–188, 2001.

DROŻDŻYŃSKI, D.; KOWALSKA, J. Rapid analysis of organic farming insecticides in soil and produce using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical Bioanalytical Chemistry** 394, 2241–2247, 2009.

DURAND, G.; BARCELÓ, D. Confirmation of chlorotriazine pesticides, their degradation products and organophosphorus pesticides in soil samples using gas chromatography-mass spectrometry with electron impact and positive and negative-ion chemical ionization. **Analytica Chimica Acta**, 243, 259–271, 1991.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 2. ed.— Rio de Janeiro: EMBRAPA-SPI, 2006a. 306 p. <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/93143/1/sistema-brasileiro-de-classificacao-dos-solos2006.pdf>>. Acesso em: 11 de julho de 2014.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistemas de Produção (Cultivo de algodão irrigado)**. 3ª Ed. 2006b. <https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistema%2Fproducao%2F16_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_r_p-76293187_sistemaProducao=7717&p_r_p-996514994_topicId=1305>. Acesso em: 09 de julho de 2014.

ESTEVE-TURRILLAS, F. A.; AMAN, C. S.; PASTOR, A.; LA GUARDIA, M. Microwave-assisted extraction of pyrethroid insecticides from soil. **Analytica Chimica Acta** 522, 73–78, 2004.

FARAJZADEH, M. A.; SEYEDI, S. E.; SHALAMZARI, M. S.; BAMOROWAT, M. Dispersive liquid–liquid microextraction using extraction solvent lighter than water. **Journal of Separation Science** 32, 3191 – 3200, 2009.

FARAJZADEH, M. A.; DJOZAN, D.; KHORRAM, P. Development of a new dispersive liquid–liquid microextraction method in a narrow-bore tube for preconcentration of triazole pesticides from aqueous samples. **Analytica Chimica Acta** 713, 70–78, 2012.

FATTAHI, N.; SAMADI, S.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M. R. M. Solid-phase extraction combined with dispersive liquid–liquid microextraction-ultra preconcentration of chlorophenols in aqueous samples. **Journal of Chromatography A** 1169, 63–69, 2007.

FENIK, J.; TANKIEWICZ, M.; BIZIUK, M.; Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. **Trends in Analytical Chemistry**, 30, 6, 814–826, 2011.

FERNANDEZ-ALVAREZ, M.; LLOMPART, M.; LAMAS, J. P.; LORES, M.; GARCIA-JARES, C.; CELA, R.; DAGNAC, T. Simultaneous determination of traces of pyrethroids, organochlorines and other main plant protection agents in agricultural soils by headspace solid-phase microextraction–gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1188, 154–163, 2008.

FERNANDES, V. C.; SUBRAMANIAN, V. C.; MATEUS, N.; DOMINGUES, V. F.; DELERUE-MATOS, C. The development and optimization of a modified single-drop microextraction method for organochlorine pesticides determination by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Microchimica Acta** 178, 195–202, 2012.

FROMBERG, A.; NILSSON, T.; LARSEN, B. R.; MONTANARELLA, L.; FACCHETTI, S.; MADSEN, J. O. Analysis of chloro- and nitroanilines and -benzenes in soils by headspace solid-phase microextraction **Journal of Chromatography A** 746, 71-81, 1996.

FU, L.; LIU, X.; HU, J.; ZHAO, X.; WANG, H.; HUANG, C.; WANG, H, Determination of Two Pesticides in Soils by Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Combined with LC-Fluorescence Detection. **Chromatographia** 70, 1697–1701, 2009.

FUENTES, E.; BÁEZ, M. E.; LABRA, R. Parameters affecting microwave-assisted extraction of organophosphorus pesticides from agricultural soil. **Journal of Chromatography A**, 1169, 40–46, 2007.

GHAMBARI, H.; HADJMOHAMMADI, M. Low-density solvent-based dispersive liquid–liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography for determination of warfarin in human plasma. **Journal of Chromatography B** 899, 66–71, 2012.

GERECKE, A. C.; TIXIER, C.; BARTELS, T.; SCHWARZENBACH, R. P.; MULLER, S. R. Determination of phenylurea herbicides in natural waters at concentrations below 1 ng l using solid-phase extraction, derivatization, and solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** 930, 9–19, 2001.

GIBSON, R.; WANG, M.; PADGETT, E.; BECK, A. J. Analysis of 4-nonylphenols, phthalates, and polychlorinated biphenyls in soils and biosolids. **Chemosphere** 61, 1336–1344, 2005.

GLAVIC, P.; LUKMAN, R. Review of sustainability terms and their definitions. **Journal of Cleaner Production** 15, 1875 - 1885, 2007.

GONÇALVES, C.; ALPENDURADA, M.F. Multiresidue method for the simultaneous determination of four groups of pesticides in ground and drinking waters, using solid-phase microextraction–gas chromatography with electron-capture and thermionic specific detection **Journal of Chromatography A** 968, 177–190, 2002.

GONÇALVES, C.; ALPENDURADA, M.F. Assessment of pesticide contamination in soil samples from an intensive horticulture area, using ultrasonic extraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Talanta** 65, 1179–1189, 2005.

GOULART, S.M.; QUEIROZ, M.E.L.R.; NEVES, A. A., QUEIROZ, J.H. Low-Temperature Clean-Up Method for the Determination of Pyrethroids in Milk Using Gas Chromatography with Electron Capture Detection. **Talanta** 75, 1320-1323, 2008.

GOULART, S. M.; ALVES, R. D.; de Paula, W. X.; de Queiroz, J. H. Neves, A. A.; de Queiroz, M.E.L.R. Determination of Carbamates in Beverages by Liquid-Liquid Extraction with Low Temperature Partitioning and Liquid Chromatography. **J. Braz. Chem. Soc.** 23 (6), 1154-1165, 2012

GUO, L.; LEE, H. K. Low-density solvent-based solvent demulsification dispersive liquid-liquid microextraction for the fast determination of trace levels of sixteen priority polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples. **Journal of Chromatography A** 1218, 5040-5046, 2011.

HO, Y.; TSOI, Y.; LEUNG, K. S. Highly sensitive and selective organophosphate screening in twelve commodities of fruits, vegetables and herbal medicines by dispersive liquid–liquid microextraction. **Analytica Chimica Acta** 775, 58– 66, 2013.

HU, J; FU, L.; ZHAO, X.; LIU, X.; WANG, H.; WANG, X; DAI, L. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography–electron capture detection for the determination of polychlorinated biphenyls in soils. **Analytica Chimica Acta** 640, 100–105, 2009.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental.** Rafaela Maciel Rebelo.- Brasília: Ibama, 2010. <http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/produtos_agrotoxicos_comercializados_brasil_2009.pdf> Acesso em: 08 de julho de 2014.

IBAÑEZ, M.; POZO, O. J.; SANCHO, J. V.; LÓPEZ, F. J.; HERNÁNDEZ, F. Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1081, 145–155, 2005.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos.** Documento de caráter orientativo DOQ-CGCRE-008. Revisão 2, jun. 2007, 25 p.

JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Solvent Microextraction into a Single Drop. **Analytical Chemistry** 68, 2236-2240, 1996.

JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Mass Transfer Characteristics of Solvent Extraction into a Single Drop at the Tip of a Syringe Needle. **Analytical Chemistry** 69, 235-239, 1997.

JOHNSON, D.L. A universal definition of soil. **Quaternary International** 51–52, 6-7, 1998.

JOVANOVIĆ, P.; GUZSVÁNY, V.; FRANKO, M.; LAZIĆ, S.; SAKAČ, M.; MILOVANOVIĆ, I.; NEDELJKOVIĆ, N. Development of multiresidue DLLME and QuEChERS based LC–MS/MS method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey liqueur. **Food Research International** 55, 11–19, 2014.

KJBLHOLT, J. Determination of trace amounts of organophosphorus pesticides and related compounds in soils and sediments using capillary gas chromatography and a nitrogen phosphorus detector. **Journal of Chromatography**, 325, 231-238, 1985.

KOCÚROVÁ, L.; BALOGH, I. I.; ŠANDREJOVÁ, J.; ANDRUCH, V. Recent advances in dispersive liquid–liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review. **Microchemical Journal** 102, 11–17, 2012.

KOZANI, R. R.; ASSADI, Y.; SHEMIRANI, F.; HOSSEINI, M. -R. M.; JAMALI, M. R. Part-per-trillion determination of chlorobenzenes in water using dispersive liquid–liquid microextraction combined gas chromatography–electron capture detection. **Talanta** 72, 387-39, 2007.

LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Sensitive trace enrichment of environmental androgen vinclozolin from natural waters and sediment samples using hollow-fiber liquid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A** 1061, 11–18, 2004.

LAWRENCE, J.F.; MCLEOD, H.A. A Low Temperature Cleanup Procedure for Triazine Herbicides in Root Crops. **Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology**, 12, 752-758, 1974.

LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOU, M. J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C. C. “Green chemistry” – os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, 26, 1, 123-129, 2003.

LENTZA-RIZOS, C.; AVRAMIDES, E. J.; CHERASCO, F. Low-temperature clean-up method for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. **Journal of Chromatography A** 912, 135–142, 2001.

LEONG, M. -I.; HUANG, S. -D. Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A** 1211, 8-12, 2008.

LEONG, M.; CHANG, C.; FUH, M.; HUANG, S. Low toxic dispersive liquid–liquid microextraction using halosolvents for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. **Journal of Chromatography A** 1217, 5455–5461, 2010.

LESUEUR, C.; M. GARTNER, M.; MENTLER, A.; FUERHACKERB, M. Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography–massspectrometry and liquid chromatography–ion trap–mass spectrometry. **Talanta** 75, 284–293, 2008.

LIU, H.; DASGUPTA, P. K. Analytical Chemistry in a Drop - Solvent Extraction in a Microdrop. **Analytical Chemistry** 68, 1817-1821, 1996.

LIU, L.; CHENG, J.; MATSADIQ, G.; ZHOU, H.; LI, J. Application of DLLME to the Determination of Pyrethroids in Aqueous Samples **Chromatographia** 72, 1017–1019, 2010.

MCBRIDE, M. B.: **Environmental Chemistry of Soils**. Oxford University. New York, 1994. 406 p.

MCLEOD, H. A.; WALES, P. J. A low temperature cleanup procedure for pesticides and their metabolites in biological samples **Journal Of Agricultural and Food Chemistry** 2, 624-627, 1972.

MAGALHÃES, E. J.; QUEIROZ, M. E. L. R.; PENIDO, M. L. O.; PAIVA, M. A. R.; TEODORO, J. A. R.; AUGUSTI, R.; NASCENTES, C. C. Determination of cocaine in postmortem human liver exposed to overdose. Application of an innovative and efficient extraction/clean up procedure and gas chromatography–mass spectrometry analysis. **Journal of Chromatography A** 1309, 15– 21, 2013.

MANAHAN, S. E.: **Environmental Chemistry**. 6a. ed. Lewis Publishers. Boca Raton, 1994. 811p.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica**. 1. ed. Ângelo de Queiroz Maurício (Coordenador), Coordenação Geral de Apoio Laboratorial (CGAL). Brasília, DF, 2011, 78 p.

MARTEEL, A. E.; DAVIES, J. A.; OLSON, W. W.; ABRAHAM, M. A. Green Chemistry And Engineering: Drivers, Metrics, and Reduction to Practice. **Annual Review Environmwntal Resources** 28, 401–28, 2003.

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

MELO, A.; CUNHA, S. C.; MANSILHA, C.; AGUIAR, A.; PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Monitoring pesticide residues in greenhouse tomato by combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas-chromatography–mass spectrometry. **Food Chemistry** 135, 1071–1077, 2012.

MOHAMMADI, A.; AMELI, A.; ALIZADEH, N. Headspace solid-phase microextraction using a dodecylsulfate-doped polypyrrole film coupled to ion mobility spectrometry for the simultaneous determination of atrazine and ametryn in soil and water samples. **Talanta** 78, 1107–1114, 2009.

MOINFARA, S.; HOSSEINI, M. M. Development of dispersive liquid–liquid microextraction method for the analysis of organophosphorus pesticides in tea. **Journal of Hazardous Materials** 169, 907–911, 2009.

MUDIAM, M. K. R.; JAIN, R.; MAURYA, S. K.; KHAN, H. A.; BANDYOPADHYAY, S.; MURTHY, R. C. Low density solvent based dispersive liquid–liquid microextraction with gas chromatography–electron capture detection for the determination of cypermethrin in tissues and blood of cypermethrin treated rats. **Journal of Chromatography B** 895– 896, 65– 70, 2012.

NAEENI, M. H.; YAMINI, Y.; REZAEI, M. Combination of supercritical fluid extraction with dispersive liquid–liquid microextraction for extraction of organophosphorus pesticides from soil and marine sediment samples. **Journal of Supercritical Fluids** 57, 219–226, 2011.

OPAS/OMS - ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. Ministério da Saúde - Escritório Regional da Organização Mundial de Saúde. Brasília, DF, 1997, 69 p.

PADILLA-SÁNCHEZ, J. A.; PLAZA-BOLAÑOS, P.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; GARRIDO-FRENICHA, A.; VIDALA, J. L. M. Application of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe-based method for the simultaneous extraction of chlorophenols, alkylphenols, nitrophenols and cresols in agricultural soils, analyzed by using gas chromatography–triple quadrupole-mass spectrometry/mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1217, 5724–5731, 2010.

PAGLIUCA, G.; GAZZOTTI, T.; ZIRONI, E.; STICCA, P. Residue analysis of organophosphorus pesticides in animal matrices by dual column capillary gas chromatography with nitrogen–phosphorus detection. **Journal of Chromatography A** 1071, 67–70, 2005.

PAPADAKIS, E. N.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Determination of metribuzin and major conversion products in soils by microwave-assisted water extraction followed by liquid-chromatographic analysis of extracts. **Journal of Chromatography A**, 962, 9–20, 2002.

PAULA, R. T. **Mobilidade de atrazine e ametryn em latossolo vermelho-amarelo**. 2007. 105f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, M.G, 2007.

PAWLISZYN, J. Sample Preparation: Quo Vadis? **Analytical Chemistry** 75, 2543 – 2558, 2003.

PAYE, H. S.; MELLO, J. W. V.; ABRAHÃO, W. A. P.; FILHO, E. I. F.; DIAS, L. C. P.; CASTRO, M. L. O.; MELO, S. B.; FRANÇA, M. M. Valores de referência de qualidade para metais pesados em solos no estado do espírito santo. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, 34, 2041-2051, 2010. <<http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v34n6/28.pdf>> Acesso em: 12 de julho de 2014.

PENA, M. F.; AMARAL, E. H.; SPERLING, E. V. Método para determinação de resíduos de clorpirifos em alface por cromatografia a líquido de alta eficiência. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente** 1, 37 - 44, 2003.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Pesticide determination in tomatoes by solid-liquid extraction with purification at low temperature and gas chromatography. **Food Chemistry** 121, 251–256, 2010a.

PINHO, G. P.; SILVÉRIO, F. O.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; STARLING, M. A. V. M. Influência dos constituintes químicos dos extratos de diferentes matrizes na resposta cromatográfica de agrotóxicos. **Química Nova** 33, 4, 909-913, 2010b.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Optimization of the liquid/liquid extraction method and low temperature purification (LLE/LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, 21,10, 1307-1311. 2010c.

PINTO, C. G.; LAESPADA, M. E. F.; MARTIN, S. H.; FERREIRA, A. M. C.; PAVON, J. L. P.; CORDERO, B. M. Simplified QuEChERS approach for the extraction of chlorinated compounds from soil samples. **Talanta** 81, 385–391, 2010.

PINTO, C. G.; MARTÍN, S. H.; PAVÓN, J. L. P.; CORDERO, B. M. A simplified Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe approach for the determination of trihalomethanes and benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soil matrices by fast gas chromatography with mass spectrometry detection. **Analytica Chimica Acta** 689, 129–136, 2011.

PIRSAHEBA, M.; FATTAHI, N.; SHAMSIPUR, M. Determination of organophosphorous pesticides in summer crops using ultrasound-assisted solvent extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic drop. **Food Control** 34, 378 - 385, 2013.

PLIMMER, J. R. **Chemistry of Pesticides**. Handbook of Pesticide Toxicology Volume 1: Principles. Chapter 2. 2 ed. Academic Press, San Diego, 2001.

PUIG, D.; BARCELÓ, D. Comparative study of various size-exclusion chromatographic columns for the clean-up of selected pesticides in soil samples. **Journal of Chromatography A** 673, 55-64, 1994.

RAMOS, L. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques **Journal of Chromatography A** 1221, 84 - 98, 2012.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; MILANI HOSSEINI, M.R.; AGHAEI, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A** 1116, 1-9, 2006.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A** 1217, 2342-2, 2010.

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

RIGUEIRA, L. M. B.; RIBEIRO, K. L.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; ZAMBOLIM, L.; OLIVEIRA, R. M. Determination of Chlorpyrifos and Thiamethoxam in Potato Tuber (*Solanum tuberosum* L.) and Soil of Brazil Using Solid-Liquid Extraction with Low Temperature Partitioning (SLE/LTP). **Journal of Brazilian Chemistry Society**, 24, 12, 2042-2049, 2013.

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

RÜBENSAM, G.; BARRETO, F.; HOFF, R. B.; KIST, T. L.; PIZZOLATO, T. M. A liquid-liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta** 705, 24– 29, 2011.

SALEMI, A.; RASOOLZADEH, R.; NEJAD, M. M.; VOSOUGH, M. Ultrasonic assisted headspace single drop micro-extraction and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detector for determination of organophosphorus pesticides in soil. **Analítica Chimica Acta** 769, 121–126, 2013.

SALVIA, M. V.; CREN-OLIVÉ, C.; VULLIET, E. Statistical evaluation of the influence of soil properties on recoveries and matrix effects during the analysis of pharmaceutical compounds and steroids by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** 1315, 53–60, 2013.

SANCHÉZ-BRUNETE, C.; MIGUEL, E.; TADEO, J. L. Multiresidue analysis of fungicides in soil by sonication-assisted extraction in small columns and gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, 976, 319–327, 2002.

SATTAR, M. A. Fate of Organophosphorus pesticides in soils. **Chemosphere**, 20, 3/4, 387-396, 1990.

SHEN, G.; LEE, H. K. Hollow fiber-protected liquid-phase microextraction of triazine herbicides. **Analytical Chemistry** 74, 648-654, 2002.

SILVÉRIO, F. O.; SILVA, J. S. S.; AGUIAR, M. C. S.; CACIQUE, A. P.; PINHO, G. P. Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, 35, 10, 2052-2056, 2012.

SOUSA, F. A.; COSTA, A. I. G.; QUEIROZ, M. E. L. R.; TEÓFILO, R. F.; NEVES, A. A.; PINHO, G. P. Evaluation of matrix effect on the GC response of eleven pesticides by PCA. **Food Chemistry** 135, 179–185, 2012.

TOBISZEWSKI, M.; MECHLINSKA, A.; ZYGMUNT, B.; NAMIESNIK, J. Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. **Trends in Analytical Chemistry**, 28, 8, 943-951, 2008.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Recognition and management of pesticides poisonings**. 6th Edition, 2013.

VEGA, A. B.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M. Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta** 538, 117–127, 2005.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification**. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Stuttgart, 2009.

WANG, D.; WESTON, D. P.; LYDY, M. J. Method development for the analysis of organophosphate and pyrethroid insecticides at low parts per trillion levels in water. **Talanta** 78, 1345-1351, 2009.

WANG, C.; JI, S.; WU, Q.; WU, C.; WANG, Z. Determination of Triazine Herbicides in Environmental Samples by Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Coupled with High Performance Liquid Chromatography. **Journal of Chromatographic Science** 49, 9, 689-694, 2011.

WANG, H.; YAN, H.; QIAO, J. Miniaturized matrix solid-phase dispersion combined with ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of three pyrethroids in soil. **Journal of Separation Science** 35, 292–298, 2012.

WU, Q.; LI, Y.; WANG, C.; LIU, Z.; ZANG, X.; ZHOU, X.; WANG, Z. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography–fluorescence detection for the determination of carbendazim and thiabendazole in environmental samples. **Analytica Chimica Acta** 638, 139–145, 2009a.

WU, Q.; WANG, C.; LIU, Z.; WU, C.; ZENG, X.; WEN, J.; WANG, Z. Dispersive solid-phase extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of some sulfonylurea herbicides in soil by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A** 1216, 5504–5510, 2009b.

XIONG, J.; HU, B. Comparison of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of organosulfur pesticides in environmental and beverage samples by gas chromatography with flame photometric detection **Journal of Chromatography A** 1193, 7–18, 2008.

YASIN, M.; BAUGH, P. J.; BONWICK, G. A.; DAVIES, D. H.; HANCOCK, P.; LEINOUDI, M. Analytical method development for the determination of synthetic pyrethroid insecticides in soil by gas chromatography-mass spectrometry operated in negative-ion chemical-ionization mode. **Journal of Chromatography A** 754, 235-243, 1996.

ZANG, X. -H.; WU, Q. -H.; ZHANG, M. -Y.; XI, G. -H.; WANG, Z. Developments of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Technique. **Chinese Journal of Analytical Chemistry** 37, 161-168, 2009.

ZHANG, W.; JIANG, F.; OU, J. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, 1(2):125-144, 2011.

ZHAO, E.; ZHAO, W.; HANA, L.; JIANG, S.; ZHOU, Z. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of organophosphorus pesticides in watermelon and cucumber. **Journal of Chromatography A** 1175, 137-140, 2007.