



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS EM CALDO DE CANA POR SDME/GC-ECD

Mario Rodrigo Romero

Prof. Dr. Carlos Eduardo Domingues Nazario

Campo Grande – 2018



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS EM CALDO DE CANA POR SDME/GC-ECD

Mario Rodrigo Romero

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Mestre em Química (área de concentração: Química).

Prof. Dr. Carlos Eduardo Domingues Nazario

Campo Grande - 2018

“Se A é o sucesso, então A é igual a X mais Y mais Z. O trabalho é X; Y é o lazer; e Z é manter a boca fechada. ”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade desta grande conquista pessoal e profissional.

A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) e ao Instituto de Química (INQUI) pela oportunidade em realizar este curso.

Ao Laboratório de Combustíveis (LABCOM) por oportunizar os equipamentos fundamentais para minha pesquisa.

Aos órgãos de fomento como a CAPES e a FUNDECT pelo apoio financeiro.

A empresa Tech Scientific pelo auxílio na manutenção do equipamento instrumental.

Ao Professor Dr. Carlos Eduardo Domingues Nazario pela orientação, apoio e incentivo em todos os momentos do desenvolvimento deste projeto e também nos momentos onde apareceram as dificuldades.

A equipe do LABCOM pelos ensinamentos e apoio técnico no desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus pais, Antônio Romero e Elenice Regina Romero, que neste corpo físico, me deram a chance de evoluir como ser humano; me ensinado a seguir sempre pelo caminho do bem.

Ao meu companheiro Diego Cristiano Divino pelo amor, incentivo, companheirismo e apoio em todos os momentos da minha caminhada.

Enfim.... A VIDA, agradeço!

RESUMO

A cana de açúcar é considerada uma planta tropical pertencente à família *Poaceae*. Sua plantação teve início em meados do século XVI na cidade de São Paulo, estendendo-se para as regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste. Seu plantio é direcionado para a obtenção de açúcar e etanol devido a expressiva exportação. Ao passar pelo processo da moagem é produzido o caldo de cana no qual é conhecido popularmente como garapa que conserva os nutrientes oriundos de sua matriz contribuindo para o fortalecimento de alguns órgãos como coração, estômago e cérebro, além de auxiliar na inibição de células cancerígenas nas glândulas mamárias. A criação de medidas protetoras normatizadas pela ANVISA, CONAMA, MAPA e estabelecidas pela Lei Federal 7802/89, foi necessária, devido a elevada aplicação de pesticidas proibidos no país, como é o caso dos organoclorados; havendo a necessidade no desenvolvimento de metodologias analíticas. Assim, a introdução de novas tecnologias empregando a miniaturização, redução na quantidade de solventes e a automação, baseadas nas técnicas tradicionais, foram desenvolvidas por estarem mais relacionadas com a Química Verde. Dentre elas, pode-se destacar a microextração em gota suspensa (SDME), no qual ocorre a etapa de extração e concentração dos analitos utilizando apenas alguns microlitros de solvente orgânico. Desta forma, o objetivo do trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinar resíduos de pesticidas organoclorados na matriz caldo de cana usando a SDME para extração dos analitos seguida da quantificação por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (GC-ECD). O método foi otimizado nos modos de operação HS-SDME e DI-SDME sob as condições experimentais de temperatura, solvente extrator, volume da microgota, tempo de extração, velocidade de agitação e efeito *salting out*. 1 µL foi formado nos dois modos de operação e verificou-se uma melhor eficiência de extração ao usar o modo DI-SDME. O método foi validado para nove organoclorados na faixa de 3,0 – 30,0 µg L⁻¹ (α-BHC; γ-BHC; β-BHC) e 10,0 – 30,0 µg L⁻¹ (δ-BHC; Aldrin, Dieldrin, 4,4-DDT, Endosulfan Sulfato; Metoxicloro) com um coeficiente de correlação superior a 0,956. Os limites de detecção e quantificação variaram entre 0,5 – 1,0 µg L⁻¹ e 1,0 – 3,0 µg L⁻¹, respectivamente. Devido à baixa concentração analisada, a complexidade da matriz e do tipo de extração empregada, o método apresentou precisão satisfatória para a maioria dos organoclorados detectados na matriz caldo de cana, compreendendo valores entre 0,1 e 26,4%.

Palavras Chave: Pesticidas, cana de açúcar, caldo de cana, SDME, GC-ECD

ABSTRACT

Sugarcane is considered a tropical plant belonging to the family *Poaceae*. Its planting began in the middle of the sixteenth century in the city of São Paulo, extending to the South, Southeast, Midwest and Northeast regions of Brazil. Its planting is directed to sugar and ethanol obtaining due to its expressive export. When passing through the grinding process, cane juice is produced which is popularly known as garapa that conserves the nutrients from its matrix and contributes to the strengthening of some human organs such as heart, stomach and brain. Besides, it assists in the inhibition of cancer cells in the mammary glands. The creation of protective measures regulated by ANVISA, CONAMA, MAPA and established by the Federal Law 7802/89, was necessary due to the high application of forbidden pesticides in the country, as it is the case of organochlorines. There was necessary, in the development of analytical methodologies, to verify the intake amount in foods and beverages, then. Thus, the introduction of new technologies using miniaturization, solvent reduction, and automation, based on traditional techniques, were created because they are more related to Green Chemistry. Among them, it is possible to highlight the single drop microextraction (SDME), in which the extraction stage and concentration of the analytes occurs using only a few microliters of organic solvent. On those bases, the objective of this work was to develop an analytical methodology to determine organochlorine pesticide residues in the cane juice matrix using SDME to extract the analytes followed by quantification by gas chromatography with electron capture detector (GC-ECD). The method was optimized in the operating modes HS-SDME and DI-SDME under the experimental conditions of temperature, solvent extraction, micro-volume, extraction time, stirring speed and salting out effect. 1 μL was formed in both modes of operation and a better extraction efficiency was found using the DI-SDME mode. The method was validated for nine organochlorines in the range of 3,0 – 30,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (α -BHC; γ -BHC; β -BHC) and 10,0-30,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (δ -BHC, Aldrin, Dieldrin, 4,4-DDT, Endosulfan Sulfate, Methoxychlor) with a correlation coefficient greater than 0.956. The limits of detection and quantification varied between 0,5 – 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 1,0 – 3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Due to the low concentration analyzed, the complexity of the matrix and the type of extraction employed, the method presented satisfactory accuracy for most of the organochlorines detected in the cane juice matrix, comprising values between 0,1 – 26,4%.

Keywords: Pesticides, sugar cane, cane juice, SDME, GC-ECD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modos de extração SDME. (A) headspace (HS-SDME). (B) imersão direta (DI-SDME).....	27
Figura 2 - Classificação dos diferentes modos de operação da SDME, (a) Imersão Direta (DI-SDME), (b) Fluxo Contínuo (CFME), (c) Gota a gota (DDME), (d) Gota Suspensa (DSDME), (e) Gota Sólida (DSDME), (f) <i>Headspace</i> (HS-SDME) e (g) Líquido-líquido-líquido (LLLME).....	28
Figura 3 – Diferentes configurações para HF-LPME. Em (a) configuração em forma de haste; em (b) configuração em forma de U.....	34
Figura 4 – Etapas da DLLME.....	34
Figura 5 - Formação da microgota no modo de operação DI-SDME em uma amostra de 1mL de caldo de cana filtrado + 9mL de água ultrapura. Homogeneizou-se a amostra.....	43
Figura 6 – Em (a) HS-SDME, a fase extratora (microgota) fica suspensa na superfície da fase doadora contendo os analitos e em (b) DI-SDME a fase extratora (microgota) é imersa na fase doadora contendo os analitos.....	43
Figura 7 - Cromatograma obtido por GC-ECD da injeção de 1 μ L (5 mg L ⁻¹) da solução trabalho contendo os 18 pesticidas organoclorados.....	51
Figura 8 – Cromatograma obtido por GC-ECD da injeção de 1 μ L (10mg L ⁻¹) da solução trabalho contendo os 18 pesticidas organoclorados.....	52
Figura 9 - Cromatograma obtido por GC-FID da injeção de 1 μ L (100mg L ⁻¹) da solução trabalho contendo os 18 pesticidas organoclorados.....	52
Figura 10 – Cromatograma obtido por GC-ECD da injeção de 1 μ L (5 μ g L ⁻¹) de uma extração realizada pelo modo de operação HS-SDME otimizada.....	57
Figura 11 – Representação de uma extração no modo de operação DI-SDME utilizando diferentes solventes orgânicos na formação da microgota e otimizada sob os seguintes parâmetros: solvente extrator tolueno; volume da microgota 1 μ L;	

Temperatura 47°C ; tempo de extração 30 minutos; velocidade de agitação 540 rpm.....58

Figura 12 – Representação de uma extração no modo de operação DI-SDME utilizando diferentes temperaturas e otimizada sob os seguintes parâmetros: solvente extrator tolueno; volume da microgota 1µL; Temperatura 47°C tempo de extração 30 minutos; velocidade de agitação 540 rpm.....61

Figura 13 - Extração DI-SDME em água ultrapura com elevação na temperatura e velocidade de agitação.....61

Figura 14 – Representação de uma extração no modo de operação DI-SDME em diferentes tempos e otimizada sob os seguintes parâmetros: solvente extrator tolueno; volume da microgota 1µL; Temperatura 47°C; tempo de extração 30 minutos; velocidade de agitação 540 rpm.....62

Figura 15 – Representação de uma extração no modo de operação DI-SDME utilizando diferentes velocidades de agitação e otimizada sob os seguintes parâmetros: solvente extrator tolueno; volume da microgota 1µL; Temperatura 47°C; tempo de extração 30 minutos; velocidade de agitação 540 rpm.....64

Figura 16 – Representação de uma extração no modo de operação DI-SDME através da adição de NaCl (5;10%) e otimizada sob os seguintes parâmetros: solvente extrator tolueno; volume da microgota 1µL; Temperatura 47°C; tempo de extração 30 minutos; velocidade de agitação 540 rpm.....65

Figura 17 - Em (a) cromatograma obtido por GC-ECD da injeção de 1µL de uma extração realizada pelo modo de operação DI-SDME e em (b) cromatograma de uma extração na matriz caldo de cana não fortificada.....66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da cana-de-açúcar e sólidos solúveis no caldo.....	14
Tabela 2 - Culturas agrícolas brasileiras que mais utilizam pesticidas.....	16
Tabela 3 - Classificação dos pesticidas de acordo com a toxicidade.....	18
Tabela 4 - Algumas propriedades físico-químicas dos pesticidas organoclorados.....	21
Tabela 5 - Aplicações da SDME.....	38
Tabela 6 - Diferentes técnicas de preparo de amostra empregadas na matriz caldo de cana.....	39
Tabela 7 - Recuperação do analito em função da concentração.....	49
Tabela 8 – Otimização dos parâmetros da HS-SDME.....	54
Tabela 9 - Otimização dos parâmetros da DI-SDME.....	55
Tabela 10 - Equações das retas e coeficientes de correlação (r) obtidos a partir das curvas analíticas dos pesticidas organoclorados detectados.....	67
Tabela 11 - Média das áreas dos picos e coeficientes de variação obtidos para cada pesticida organoclorado detectado na avaliação da precisão do método.....	69
Tabela 12 – Recuperação dos organoclorados detectados em amostras de caldo de cana.....	70
Tabela 13 – Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos 9 organoclorados detectados.....	71
Tabela 14 - Diferentes técnicas de preparo de amostra empregadas na matriz caldo de cana.....	72
Tabela 15 – Aplicação da SDME no modo de operação DI-SDME em amostras de caldo de cana.....	73

SUMÁRIO

1.0. INTRODUÇÃO	12
1.1. Cana-de-açúcar	12
1.2. Caldo de Cana	13
1.3. Pesticidas: Uma visão geral	15
1.3.1. Classificação e Toxicidade	17
1.3.2. Pesticidas Organoclorados	19
1.3.3. Limite Máximo de Resíduo (LMR)	24
1.4. Técnicas de Preparo de Amostra	25
1.4.1. LPME	26
1.5. Parâmetros da SDME	35
1.5.1. Solvente Extrator	35
1.5.2. Volume da microgota	35
1.5.3. Temperatura	36
1.5.4. Tempo de Extração	36
1.5.5. Velocidade de agitação	37
1.5.6. Adição de sal (salting out)	37
1.6. Aplicações da SDME	37
2.0. OBJETIVOS	41
2.1. Objetivo Geral	40
2.2. Objetivos específicos	40
3.0. PARTE EXPERIMENTAL	41
3.1. Padrões e Reagentes	41
3.2. Equipamentos e Materiais	41
3.3. Obtenção e Preparação das Amostras de Caldo de Cana	42
3.4. Microextração em gota suspensa (SDME)	43
3.4.1. HS-SDME	44
3.4.2. DI-SDME	44
3.5. Separação Cromatográfica	45
3.6. Validação	46
3.6.1. Seletividade	46
3.6.2. Linearidade	47

3.6.3. Precisão	47
3.6.4. Exatidão	48
3.6.5. Limite de Detecção	50
3.6.6. Limite de Quantificação	50
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1. Separação Cromatográfica	50
4.2. Otimização das condições experimentais da SDME	53
4.2.1. Solvente extrator	55
4.2.2. Volume da fase extratora	58
4.2.3. Temperatura	60
4.2.4. Tempo de extração	62
4.2.5. Velocidade de agitação	63
4.2.6. Efeito salting out	64
4.3. Desempenho analítico do método	65
4.3.1. Seletividade	66
4.3.2. Linearidade	67
4.3.3. Precisão	68
4.3.4. Exatidão	70
4.3.5. Limites de detecção e quantificação	71
4.4. Análise Comparativa	71
4.5. Aplicação em amostras reais de Caldo de Cana	72
5.0. CONCLUSÃO	74
6.0. PERSPECTIVAS FUTURAS	76
7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

1.0. INTRODUÇÃO

1.1. Cana-de-açúcar

O início das plantações da cana-de-açúcar, deu-se em São Paulo, em meados do século XVI estendendo seu cultivo para as regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste, destacando-se pela tecnologia empregada nas diferentes etapas do processo e permitindo duas safras anuais. Teve como origem a Indonésia e Nova Guiné, espalhando-se para o Arquipélago Malaio e para as ilhas do sul do Oceano Pacífico¹⁻³. As primeiras mudas, chegaram ao Brasil em meados de 1502 e com o passar do tempo, os engenhos produziam açúcar que era utilizado para a fabricação de alimentos e bebidas com a mesma qualidade do que era produzido na Índia. Sua cultura, deu sustentação ao processo de colonização do Brasil e foi na capitania de Pernambuco que se implantou o primeiro centro açucareiro, devido ao solo e clima favoráveis^{2,3}.

Em seu processo produtivo, as transformações geraram uma notoriedade para o mercado interno e externo, com ênfase ao agronegócio brasileiro, onde destacando-se internacionalmente como um dos maiores produtores, seguido pela China, Tailândia, Austrália e Índia^{2,4}.

Em meados de 2017, foi proposto pela *Sugarcane Industry Association* (UNICA) e pelo governo de São Paulo que a colheita deveria ser mecanizada, devido a contaminação no ecossistema pela queima da palha. Emergiram então, novas tecnologias que proporcionaram melhorias em seu cultivo, onde a palha passaria a ser geradora de energia^{3,5}.

Considerada uma planta tropical, pertencente à família *Poácea*, a cana tem seu plantio direcionado a obtenção de açúcar (sacarose) e etanol devido a expressiva exportação⁴.

Através de sua moagem, alguns produtos são obtidos, como o caldo de cana, rapadura, aguardente, ração animal e variedades forrageiras. Também é uma excelente matéria prima na produção de biodiesel e etanol, integrando os sistemas agrícolas e industriais⁶⁻⁸.

1.2.Caldo de Cana

Conhecido popularmente como garapa, o caldo de cana é uma bebida típica brasileira, refrescante e muito saborosa. Possui coloração variável de pardo a verde escuro e muito consistente. Pode ser consumido *in natura* ou misturado em frutas, como limão e abacaxi. Através dele, são obtidos o caldo de cana em pó (açúcar mascavo) e o melado^{6,9}.

O caldo de cana está situado entre os colmos da fase sólida na cana de açúcar formando um composto bifásico, onde a fase sólida é constituída por um complexo (pentoxan e lignocelulósico), que gera os entrenós⁹. Uma grande quantidade de compostos orgânicos e inorgânicos são encontrados em sua fase líquida (caldo). Os orgânicos apresentam-se na forma de frutose, sacarose, glicose, aminoácidos, proteínas, gorduras, ácidos, pectina, clorofila, antocianina e sacaretina; os inorgânicos na forma de sílica, potássio, cálcio, cloro, alumínio e água (presente em maior quantidade)^{4,6,10}.

É rica em carboidratos e conserva todos os nutrientes da cana-de-açúcar essenciais ao organismo humano, como ferro, potássio, sódio, fósforo, magnésio, cálcio, vitaminas do complexo B, vitamina (A, C), amido, proteínas, ácidos graxos e alguns antioxidantes como flavonóides e ácidos fenólicos, apresentados na Tabela 1. O açúcar do caldo de cana, apresenta-se em sua forma bruta rico em nutrientes e minerais, diferenciando-o do refinado que por sua vez, utiliza diversos produtos químicos, eliminando totalmente os nutrientes e minerais, resultando em um produto rico em calorias. O elevado consumo de açúcar refinado, produz um estado de superacidez que desmineraliza o organismo, levando a carência de minerais^{4,6,9,10}.

TABELA 1 - Composição da cana-de-açúcar e sólidos solúveis no caldo.

COMPONENTES DA CANA DE AÇÚCAR	(%) EM MASSA NA CANA DE AÇÚCAR
Água	73-76
Sólidos	24-27
Sólidos solúveis	10-16
Fibra (seca)	11-16

CONSTITUINTES DO CALDO DE CANA	(%) EM SÓLIDOS SOLÚVEIS
Açúcares	75-92
Sacarose	70-88
Glicose	2-4
Frutose	2-4
Sais	3,0-4,5
Ácidos orgânicos	1,5-5,5
Ácidos carboxílicos	1,1-3,0
Aminoácidos	0,5-2,5
Proteínas	0,5-0,6
Amido	0,001-0,100
Gomas	0,30-0,60
Ceras, gorduras, fosfolipídeos	0,05-0,15

Referência [4]

Tem como propriedades, estimular e revitalizar a energia corporal, sendo muito consumida por atletas e competidores como suplemento alimentar. Além disso, auxilia no fortalecimento de alguns órgãos do corpo, como coração, cérebro, estômago, rins, olhos, órgãos sexuais e auxilia na inibição de células cancerígenas nas glândulas mamárias^{4,7}.

A partir de suas propriedades intrínsecas, houve um aumento no consumo desta bebida e atualmente as indústrias vem produzindo caldo de cana envasado em garrafas de vidro ou caixas Tetra Pak. Além disso, o mercado nacional vem

produzindo outros tipos de bebidas de caldo de cana como chope, cerveja, caipirinha e sucos gourmet.

A sua comercialização é feita por meio de vendedores ambulantes espalhados pelas cidades brasileiras, em carros e nas feiras livres. Muitas vezes não apresentam condições higiênico sanitárias para a manipulação de alimentos, afetando diretamente a saúde do consumidor^{5,9}.

1.3.Pesticidas: Uma visão geral

Segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*, os pesticidas pertencem a uma vasta classe de compostos que produzem efeitos nocivos ao ecossistema. São amplamente utilizados pelos agricultores principalmente na produção e armazenamento de alimentos, sendo uma ferramenta efetiva para o controle e destruição de pragas, fungos, insetos e ervas daninhas. É muito utilizado para o controle de pragas em residências, no cultivo de gramíneas e na indústria¹¹⁻¹³. Com a evolução dessas espécies, criou-se uma certa resistência aos pesticidas existentes, então, foram necessárias pesquisas para o desenvolvimento de substâncias mais potentes, que trouxeram consequências negativas ao meio ambiente e também a saúde humana, animal e outras espécies importantes ao ecossistema, quando aplicadas em concentrações superiores a recomendada^{3,4,7}.

O consumo de pesticidas no Brasil teve um aumento significativo de 42 % no período de 2002 a 2011. Esta porcentagem demonstra, que houve uma evolução na produtividade agrícola, porém, o aumento no impacto ambiental foi inevitável. Ao serem comparadas as regiões, verifica-se que a região Sudeste consome cerca de 38% de pesticidas nas lavouras, seguido pelo Sul (31%) e Centro-Oeste (23%). Nas regiões Norte e Nordeste comparativamente o consume é menor, cerca de 1% e 6% respectivamente. Os estados que mais se destacam são: São Paulo (25%), Paraná (16%), Mato Grosso do Sul (5%), Mato Grosso (9%), Minas Gerais e Rio Grande do Sul (12%)^{8,14}. São apresentados na Tabela 2, as culturas agrícolas brasileiras que mais utilizam pesticidas.

TABELA 2 – Culturas agrícolas brasileiras que mais utilizam pesticidas

Soja	40%
Milho	15%
Cana-de-açúcar	10%
Algodão	10%
Cítricos	7%
Café	3%
Trigo	3%
Arroz	3%
Feijão	2%
Batata	1%
Tomate	1%
Maçã	0,5%
Outras culturas	3,3%

Referência [14]

Considerado o sétimo maior consumidor de agrotóxicos do país, o estado do Mato Grosso do Sul entre os anos de 2007 a 2012 teve um aumento da taxa de consumo de pesticidas passando de 4,44 Kg/ha para 10,69 Kg/ha em 3 milhões de hectares de área. Produz principalmente café, feijão e mandioca, com predominância de 95% nos cultivos de soja, milho e cana-de-açúcar¹⁵.

A Organização Mundial da Saúde (OMS), estima que entre 2016 e 2020, 15% das mortes sejam causadas por doenças no sistema imunológico, neurológico, congênito e genético. São absorvidos pelo organismo e acumulam-se nos tecidos lipídicos, tornando necessário um constante monitoramento em sua aplicação. Possuem uma elevada estabilidade química e apresentam pouca solubilidade em água e alta em solventes orgânicos^{14,16}.

No sentido de minimizar os impactos negativos causados pelos pesticidas, foi necessário a criação de medidas protetoras, normatizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estabelecendo um Limite Máximo de Resíduos (LMR), expresso em mg/kg de alimento, descrito na lei federal nº 7.802/89 no decreto 4.074/02¹⁷. Com base na Lei, só podem ser registrados

no país os pesticidas cujos ingredientes ativos não tragam danos aos organismos vivos. No intuito de padronizar as normas e diretrizes em vários países, houve a criação do *Codex Alimentarius* pelas organizações *Food and Agriculture Organization (FAO)* e *World Health Organization (WHO)* ^{16,18}.

1.3.1. Classificação e Toxicidade

De acordo com a lei federal nº 7.802/89, os termos pesticidas, agrotóxicos e defensivos agrícolas também podem ser utilizados e são definidos como produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas e outros ecossistemas. Possuem a finalidade de alterar a composição da flora ou da fauna, preservando-as da ação de organismos vivos considerados nocivos^{16,18}.

A classificação dos pesticidas se dá de acordo com: finalidade, ação, toxicidade, origem, persistência, deslocamento e duração do efeito de tratamento^{8,11,19}.

- Quanto a finalidade: acaricida (combate ácaros); inseticida (combate insetos); nematicida (combate aos nematoides); rodenticida (combate aos roedores); fungicida (combate fungos); herbicida (combate ervas daninhas).
- Quanto a ação: contato (via dérmica); Ingestão (via oral); fumegante (vias respiratórias).
- Quanto a toxicidade: são divididos em 4 classes, de acordo com a Tabela 3:

TABELA 3 - Classificação dos pesticidas de acordo com a toxicidade.

CLASSE	CATEGORIA
I-A	Extremamente tóxico (tarja vermelha)
I-B	Altamente tóxico (tarja amarela)
II	Moderadamente tóxico (tarja azul)
III	Levemente tóxico (tarja verde)

Referência ^[14]

- Quanto a origem: quimicamente podem ser classificados como inorgânicos (à base de bário, flúor, antimônio, boro, chumbo, cádmio, mercúrio, nitrogênio) e orgânicos (sintéticos e naturais). Os sintéticos são conhecidos como clorofosforados, organofosforados, organoclorados, carbamatos, piretróides, dinitro composto, cloronitrofenol, entre outros. E os de origem vegetal as piretrinas, antibióticos e fitocidas.
- Quanto a persistência: são classificados de acordo com a meia vida que é o tempo necessário após a aplicação para que sua eficácia seja reduzida à metade. Persistência curta (até 90 dias); média (91 a 180 dias) e longa (maior que 180 dias).
- Quanto ao deslocamento: o deslocamento do pesticida no ambiente durante sua meia vida pode ser pequeno (até 20 cm); médio (de 21 a 60 cm) e grande (maior que 60 cm).
- Quanto a duração do efeito do tratamento: efeito residual (o ingrediente ativo permanece em dosagens letais no organismo alvo por semanas ou meses); efeito instantâneo (o efeito é imediato logo que aplicado sobre o organismo que se quer combater).

1.3.2. Pesticidas Organoclorados

Foram os primeiros praguicidas sintetizados, datados de 1874, porém somente em 1939 Paul Muller descobriu a propriedade do dicloro-difenil-tricloro etano (DDT), que por um longo período foi utilizado por possuir uma alta eficiência e baixo custo. Com base nisto, outros organoclorados foram sintetizados e somente em 1970 houve a comprovação do aumento no nível de contaminação em organismos vivos, resultando em sua proibição em diversos países, pelo fato também, da alta persistência no ambiente (até 30 anos no solo) e alta toxicidade^{11,20,21}.

São compostos orgânicos sintéticos que possuem pelo menos uma estrutura cíclica em sua composição, sendo ela aromática ou não, onde vários átomos de hidrogênios são substituídos por átomos de cloro pertencendo ao grupo dos compostos halogenados²⁰. A Tabela 4 apresenta alguns pesticidas organoclorados e suas propriedades físico-químicas.

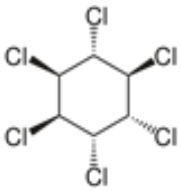
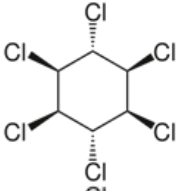
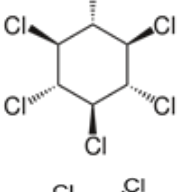
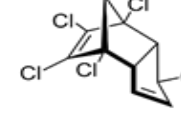
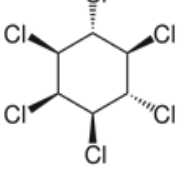
No Brasil, foram amplamente utilizados na agricultura para eliminar pragas e ervas daninhas das plantações. Seu uso foi interrompido pela Portaria nº 329, de 02 de setembro de 1985, havendo a necessidade de resguardar a saúde humana, animal e o meio ambiente da ação de pesticidas de alta persistência e periculosidade, proibindo sua comercialização, uso e distribuição²². Em seu artigo 1º o uso de pesticidas organoclorados se dará somente para²²:

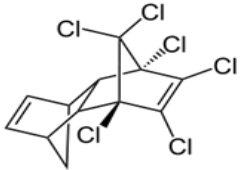
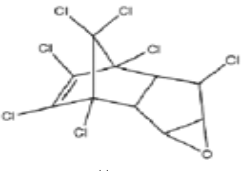
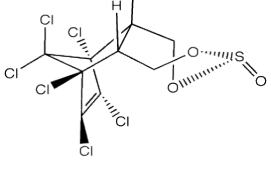
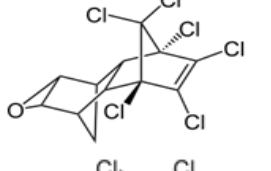
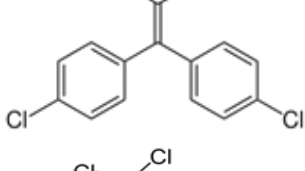
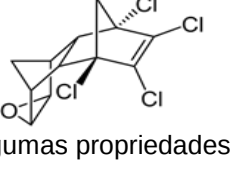
- Iscas formicidas a base de Aldrin e Dodecacloro;
- Cupinicidas a base de Aldrin para o emprego em florestamento e reflorestamento;
- Quando aplicados pelos órgãos públicos competentes em campanhas de saúde no combate a vetores de agentes etiológicos de moléstias;
- Em emergências na agricultura a critério da Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária (SNAD) do Ministério da Agricultura;

Com baixo peso molecular e geralmente pouco solúveis em água e solúveis em solventes orgânicos os pesticidas organoclorados possuem alta toxicidade e fácil absorção pelas vias dérmicas, respiratórias e digestivas. Devido sua elevada lipossolubilidade e lenta metabolização, acumulam-se facilmente no

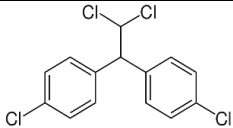
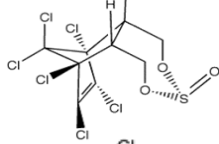
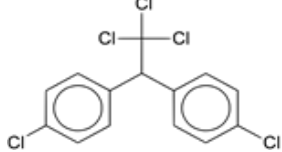
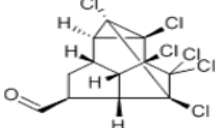
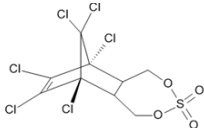
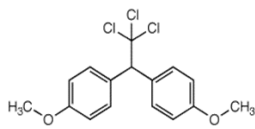
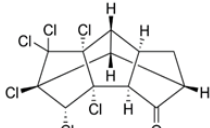
tecido adiposo e são excretados pela urina, leite materno e fezes, deixando efeitos irreversíveis no organismo^{20,23,24}. O alto grau de estabilidade desses compostos em relação as degradações físicas, químicas, biológicas e o elevado tempo de meia vida no ambiente, lhe conferem a inserção nos POP's (Poluentes Orgânicos Persistentes)^{23,25}.

TABELA 4 – Algumas propriedades físico-químicas dos pesticidas organoclorados.

Pesticidas	Estrutura Molecular	Fórmula molecular	Peso Molecular	Ponto de Ebulição (°C)	Ponto de Fusão (°C)	Solubilidade em água (g.mL ⁻¹)
α -BHC		C ₆ H ₆ Cl ₆	290.83	288	159,5	2,0.10 ⁻⁴
γ -BHC		C ₆ H ₆ Cl ₆	290.83	323,4	112,5	7,3.10 ⁻⁴
β -BHC		C ₆ H ₆ Cl ₆	290.83	323	314,5	5,0.10 ⁻⁴
Heptacloro		C ₁₀ H ₅ Cl ₇	373	135	95	1,8.10 ⁻⁵
δ -BHC		C ₆ H ₆ Cl ₆	290,83	287,99	141,5	2,1.10 ⁻³

Pesticidas	Estrutura molecular	Fórmula molecular	Peso Molecular	Ponto de Ebulição (°C)	Ponto de Fusão (°C)	Solubilidade em água (g.mL ⁻¹)
Aldrin		C ₁₂ H ₈ Cl ₆	365	145	104	1,8.10 ⁻⁵
Isômero do Heptacloro Epóxido		C ₁₀ H ₅ Cl ₇ O	389	200	160	2,8.10 ⁻⁵
α-Endosulfan		C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	407	200	108	5,3.10 ⁻⁵
Dieldrin		C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	381	385	176	2,0.10 ⁻⁵
4,4-DDE		C ₁₄ H ₈ Cl ₄	318,03	316	88	1,3.10 ⁻⁷
Endrin		C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	380,91	245	200	2,6.10 ⁻⁵

Continuação da TABELA 4 - algumas propriedades físico-químicas dos pesticidas organoclorados

Pesticidas	Estrutura molecular	Fórmula molecular	Peso Molecular	Ponto de Ebulição (°C)	Ponto de Fusão (°C)	Solubilidade em água (g.mL ⁻¹)
4,4-DDD		C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄	320	193	109	1,6.10 ⁻⁵
β-Endosulfan		C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	407	390	207	2,8.10 ⁻⁵
4,4-DDT		C ₁₄ H ₉ Cl ₅	354	260	108,5	1,3.10 ⁻⁷
Endrin Aldeído		C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	380,91	429.75	181	2,4x10 ⁻²
Endosulfan Sulfato		C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₄	423	200	181	1,2x10 ⁻⁵
Metóxi cloro		C ₁₆ H ₁₅ Cl ₃ O ₂	346	346	78	1,0x10 ⁻⁵
Endrin Cetona		C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	380,91	81	285	2,4x10 ⁻²

Continuação da TABELA 4 - algumas propriedades físico-químicas dos pesticidas organoclorados

1.3.3.Limite Máximo de Resíduo (LMR)

Para os efeitos do DECRETO Nº 4.074, DE 4 DE JANEIRO DE 2002, que regulamenta a Lei 7.802, de 11 de julho de 1989, em seu Art. 1º entende-se por Limite Máximo de Resíduo (LMR) a quantidade máxima de resíduo de pesticida ou afim, oficialmente aceita no alimento em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até seu consumo. É expressa em partes (peso) de pesticida, ou seus resíduos em partes por milhão de alimento (ppm ou mg/kg)²⁶.

A partir de estudos toxicológicos, é realizado os cálculos da Ingestão Diária Aceitável (IDA) para cada ingrediente ativo (IA), estabelecendo o Limite Máximo de Resíduo (LMR) e o intervalo de segurança. A ANVISA juntamente com o MAPA, são os órgãos responsáveis por fiscalizar e monitorar os resíduos dos produtos alimentares. Na avaliação toxicológica para fins de registrar os pesticidas, primeiramente é realizado o cálculo da Ingestão Diária Máxima Teórica (IDMT) como mostra a equação (1)^{16,27}. Internacionalmente a (IDA) e o (LMR) são estabelecidos através do Comitê de Resíduos de Pesticidas em Alimentos (CCPR), onde estão inclusos órgãos, como: FAO (*Food and Agricultural*), WHO (*World Health Organization*) e o CODEX Alimentarius Mundial.

$$IDMT = \frac{\sum(LMR \times Consumo \text{ do alimento})}{Peso \text{ corpóreo}} \quad (1)$$

em que:

IDMT é a ingestão diária máxima teórica;

LMR é o limite máximo de resíduo

Os (LMR) estabelecidos para os pesticidas, são considerados seguros para os organismos vivos, quando a (IDMT) não ultrapassar a (IDA), ou seja, o cálculo realizado

pela equação 1, estima a quantidade máxima de agrotóxicos que uma pessoa pode ingerir diariamente²⁷.

De acordo com a Portaria nº 329, de 02 de setembro de 1985, fica expressamente proibido em território nacional a comercialização, o uso e a distribuição de pesticidas organoclorados, não havendo LMR para quaisquer tipos de alimentos. Em virtude disso, evidencia-se a importância no desenvolvimento de pesquisas e metodologias analíticas para a determinação de resíduos de pesticidas organoclorados em alimentos e amostras ambientais, assegurando condições saudáveis aos organismos vivos^{10,16,27}

1.4.Técnicas de Preparo de Amostra

Devido à complexidade das matrizes e dos analitos determinados, uma etapa de preparo de amostra torna-se necessário. É nesta etapa, que ocorre a pré-concentração da amostra, a extração dos analitos de interesse e a eliminação de possíveis interferentes (*clean-up*) evitando o acúmulo de sujeiras nas colunas cromatográficas, no sistema de injeção e qualquer contaminante que possa eluir juntamente com o analito. Ela é determinante para obtenção de resultados confiáveis nas análises; demanda grande parte do tempo e é passível a erros²⁸⁻³⁰

Verificando a importância de um preparo de amostra, várias técnicas de extração tem sido utilizadas de acordo com o estado físico, químico e a complexidade da matriz. São conhecidas como técnicas tradicionais de preparo de amostra. São muito utilizadas atualmente, porém seu uso envolve várias etapas, demandando tempo e alto custo. As principais são^{31,32} :

- Extração líquido-líquido (LLE, do inglês, *Liquid-liquid Extraction*): é uma técnica que demanda tempo, devido a sua execução possuir vários passos. Utiliza uma quantidade de solvente orgânico elevada e gera muitos resíduos.
- Extração com Soxhlet: foi uma das técnicas de extração mais utilizadas no século XX. Tem como maior limitação o tempo (horas, dias), necessário para obter um bom rendimento extrativo.

- Extração em fase sólida (SPE, *Solid-Phase Extraction*): surgiu para minimizar as limitações da LLE, porém, demanda gastos com acessórios e cartuchos.

Na intenção de diminuir a quantidade de solvente orgânico, gerar menos resíduos, diminuir a manipulação da amostra e um menor custo de análise, diversas técnicas miniaturizadas de preparo de amostra tem se destacado. Essa miniaturização das técnicas, são menos agressivas ao meio ambiente e a saúde dos analistas. Tornaram-se tendência em química analítica e estão mais relacionadas com a Química Verde quando comparadas às tradicionais^{31,33}. São técnicas simples, rápidas, econômicas, possuem elevado fator de concentração dos analitos, possibilidade de automatização e mínima quantidade de solvente orgânico (fase extratora) usado³⁴.

As principais técnicas miniaturizadas de preparo de amostra são²⁸:

- SPME (microextração em fase sólida);
- MEPS (microextração em sorvente empacotado);
- SBSE (extração sortiva em barra de agitação);
- LPME (microextração em fase líquida);

Algumas delas podem apresentar modificações; sendo tratadas como técnicas diferentes³⁴.

A LPME subdivide-se em³⁵:

- SDME (microextração em gota suspensa);
- HF-LPME (microextração com fibras ocas);
- DLLME (microextração líquido-líquido dispersiva);

1.4.1.LPME

É uma técnica que utiliza microlitros de solvente (fase extratora) imiscível em água para extrair os analitos de interesse de uma matriz aquosa (fase doadora), permitindo a redução no consumo de solvente extrator e um elevado fator de enriquecimento, quando comparada com a LLE convencional^{31,34}.

1.4.1.1. SDME

A microextração por gota suspensa, é uma implementação miniaturizada da LLE convencional e foi desenvolvida por Liu e Dasgupta e inicialmente foi aplicada nos estudos de Jeannot & Cantwell³³.

Tem seu princípio baseado na formação de uma microgota de solvente orgânico (1 – 3 μL) como fase extratora e imiscível na solução contendo os analitos (fase doadora)²⁸. A microgota fica suspensa na ponta de uma microseringa de cromatografia gasosa imersa ou não na fase doadora. É uma técnica bastante simples que não exige equipamentos específicos, não possui efeito de memória e utiliza mínima quantidade de fase extratora, estando de acordo com os propósitos da Química verde e ilustrada pela Figura 3. Além disso, minimiza tempo e possíveis problemas de diluição e contaminação, pois extração/injeção são realizadas com a mesma microseringa, sem etapas intermediárias. Os analitos determinados por esta técnica, compreendem, desde compostos orgânicos até íons metálicos^{36–38}.

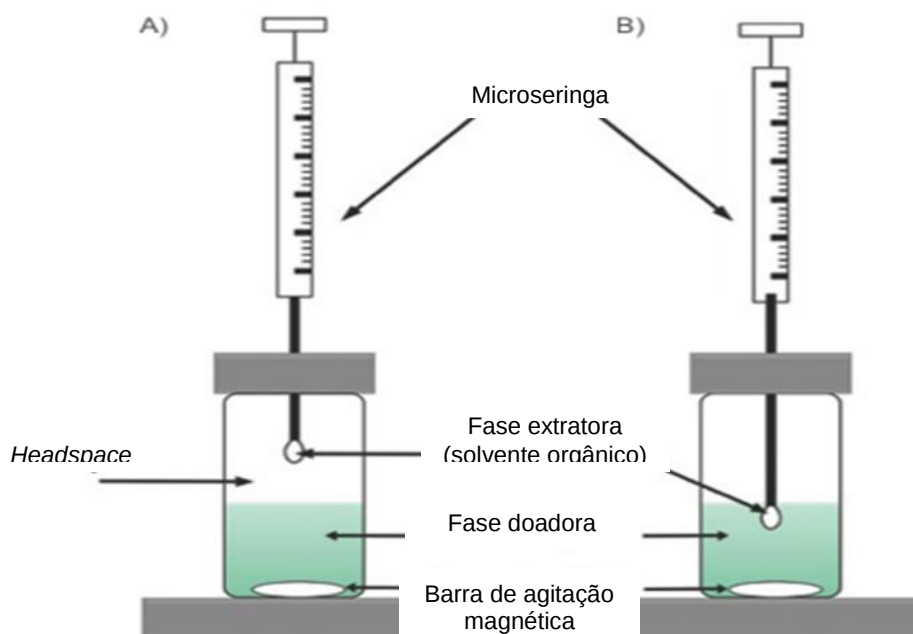


FIGURA 1 - Modos de extração SDME. (A) headspace (HS-SDME). (B) imersão direta (DI-SDME). Referência [28].

Sua aplicabilidade envolve várias técnicas instrumentais de análises, sendo as mais empregadas GC (cromatografia gasosa) e HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência); outras técnicas como eletroforese capilar (*CE-capillary electrophoresis*); espectrometria de absorção atômica (*AAS, atomic absorption spectrometry*), espectrometria de massas (*MS, mass spectrometry*) em diferentes formas de ionização, também são usadas, porém com menos frequência^{32,36,39}.

A SDME apresenta-se em diferentes modos de operação como representado na Figura 4, subdivididos em sistemas de duas ou três fases. Em um sistema de duas fases a microgota contendo a fase extratora entra em contato com a fase doadora e em um sistema de três fases os analitos presentes na fase doadora são extraídos para o *heaspace* e do *headspace* para a fase extratora^{31,40,41}.

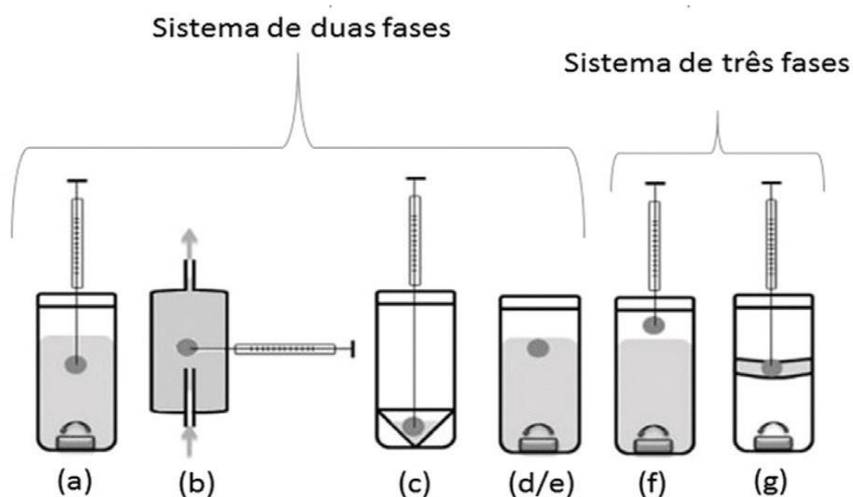


FIGURA 2 - Classificação dos diferentes modos de operação da SDME, (a) Imersão Direta (DI-SDME), (b) Fluxo Contínuo (CFME), (c) Gota a gota (DDME), (d) Gota Suspensa (DSDME), (e) Gota Sólida (DSDME), (f) *Headspace* (HS-SDME) e (g) Líquido-líquido-líquido (LLLME). Referência [41].

Representada na fig.4(a), no modo (DI-SDME), a extração é realizada através da formação da microgota (1,0 –3,0 μL) que contem a fase extratora imersa na fase doadora, havendo um contato direto entre as duas fases^{41,42}. Devido a este contato, a fase extratora deve possuir baixa pressão de vapor, ser imiscível e possuir afinidades com o analito para que ocorra o equilíbrio neste sistema. Os solventes orgânicos mais utilizados para a formação da microgota são, o tolueno, hexano, decano e octanol, onde apresentam compatibilidade com análises em GC.

Os analitos extraídos, normalmente possuem características neutras, ácidas ou básicas, apolares e semi-voláteis^{29,35}.

No processo de extração da (DI-SDME), ocorre um equilíbrio de partição do analito entre o volume da fase aquosa (V_{aq}) e o volume da fase extratora (orgânica) (V_{org}), como ocorre em uma extração convencional (LLE).

A razão de distribuição entre a concentração do analito e as fases pode ser representada pela equação 2^{36,41,43}:

$$K_d = \frac{C_{(org)}}{C_{(aq)}} \quad (2)$$

em que

C_{org} : concentração dos analitos na fase extratora (solvente orgânico);

C_{aq} : concentração dos analitos na fase aquosa (amostra);

Através da equação 3, a quantidade do analito extraído é obtido; no sentido da fase doadora para a fase extratora e um balanço de massa deve ser realizado, assim⁴¹:

$$n_{org} = \frac{K_d V_{org} V_{aq} C_{0aq}}{V_{aq} + K_d V_{org}} \quad (3)$$

onde:

n_{org} : quantidade do analito na fase extratora (solvente orgânico);

C_{0aq} : concentração inicial da amostra aquosa (fase doadora);

K_d : razão de distribuição entre as concentrações nas fases extratora e doadora;

V_{org} : volume da fase extratora (solvente orgânico);

V_{aq} : volume da amostra aquosa (fase doadora);

E a quantidade total do analito na fase aquosa é definido como:

$$n_t = n_{org} + n_{aq} \quad (4)$$

sendo:

n_t : quantidade total do analito na amostra (fase doadora);

n_{org} : quantidade do analito na fase extratora (solvente orgânico);

n_{aq} : quantidade do analito na fase aquosa (fase doadora);

A eficiência deste modo de extração, depende do volume das fases, da concentração inicial da amostra e de K_d , como mostra a equação 2⁴¹. Por possuir baixa eficiência, é considerada uma técnica não exaustiva tendo êxito com relação a exatidão obtida para a concentração do analito na fase doadora³⁶. Devido ao pequeno volume da microgota e baixa eficiência, a pouca quantidade de analito extraído, permite elevada concentração da fase extratora que varia para cada modo de operação. O fator de pré-concentração (C_{org} , C_{aqu}^0) pode ser determinado experimentalmente pela relação entre a área do pico cromatográfico obtido pela injeção direta do analito e pela área do pico obtido após a extração por SDME^{36,41,42}.

A transferência dos analitos da fase doadora para extratora foi fundamentada em duas teorias, a do filme e a da penetração; no qual o coeficiente de transferência de massa da fase doadora, representado por β_{aq} , é a etapa determinante da extração⁴¹. Como a microgota encontra-se imersa na fase doadora e sob constante agitação magnética, a teoria do filme pressupõe a existência de um filme de fase doadora próxima a microgota.^{36,43}. O movimento de agitação da fase doadora, tem um aumento progressivo da interface para o seio da mesma, sendo representado pela equação 5⁴¹:

$$\beta_{aq} = \frac{D_{aq}}{\delta_{aq}} \quad (5)$$

Onde (β_{aq}) depende do do coeficiente de difusão do analito no meio aquoso (D_{aq}) e da espessura do filme (δ_{aq}).

Oposta a teoria do filme, a teoria da penetração, pressupõe uma interface não inerte e frequentemente renovada. Durante o período de extração, o volume da fase doadora entra em contato com a fase extratora por um período de tempo

(t_e) contínuo e substituído por outra parte de fase doadora. Neste caso, (β_{aq}) depende de (D_{aq}) e do tempo de extração (t_e)^{36,41,43}.

$$\beta_{aq} = 2 \sqrt[2]{D_{aq} / \pi t_e} \quad (6)$$

A transferência de massa dos solutos (β_{aq}) é diretamente proporcional a (D_{aq}), evidenciando que, a teoria do filme é mais apropriada para explicar como se dá a transferência de massa no modo de operação DI-SDME³⁶. Para diminuir o tempo de extração, a fase doadora deve estar em contínua agitação, com auxílio de um agitador magnético. Quanto maior a agitação, menor será a espessura do filme (δ_{aq}), maior (β_{aq}) e conseqüentemente menor a estabilidade e permanência da microgota imersa^{41,43}.

Descrito na figura 4(b), a CFME é fundamentada pela exposição da microgota em um fluxo contínuo da fase doadora, circulada em uma câmara por meio de uma bomba de HPLC e tubos poliméricos de poliéter éter cetona (PEEK)^{36,41}. Após preencher a câmara com a fase doadora, a microgota é formada no sistema através de uma válvula de injeção manual para HPLC, ficando suspensa na ponta do tubo polimérico no centro do sistema de extração. A fase doadora circula constantemente na circunvizinhança da microgota, que após um certo tempo, é retirada e injetada em equipamentos de análises^{36,41,43}. Este modo de extração, permite que os analitos presentes na fase doadora sejam extraídos com maior eficiência ao ser comparado com os outros modos de operação. O fluxo constante da fase doadora produz mecanismos de difusão e convecção⁴¹. Desta forma, são obtidos, menores tempos de extração e elevados valores de pré-concentração. Sua aplicabilidade é limitada a compostos com características apolares e baixa volatilidade, sendo que a fase extratora apolar é estável em um sistema de vazão continuada. Há necessidade em utilizar equipamentos adicionais, como é o caso de bombas de microinfusão^{36,41,43}.

Conhecida como miniaturização da DI-SDME por possuir características semelhantes, o modo (DDME) exibido na figura 4 (c), é muito utilizada para pequenos volumes de fase doadora (inferior a 50 μ L), no que resulta em uma diminuição nos fatores de pré-concentração⁴⁴. Neste caso, o equilíbrio do analito

entre as duas fases ocorre rapidamente, sendo desnecessário uma agitação. É um sistema simples e há uma maior estabilidade da microgota. Para baixos limites de detecção (LD) este modo não é efetivo, mas satisfatório para um rápido *clean-up* e elevada seletividade^{36,41}.

O processo extrativo dos modos (DSDME) e (SFDME) ilustrados na figura 4 (d;e), consiste em agitar a fase doadora através de uma barra de agitação até obter um vórtice suave⁴³. A formação da microgota ocorre no centro do vórtice e não permanece suspensa na ponta da microseringa. Neste caso, o volume da fase extratora pode ser maior, quando comparado com os outros modos de operação. A fase extratora é agitada juntamente com a fase doadora, ocorrendo um aumento na transferência de massa entre as fases e uma diminuição no tempo de extração. Mesmo apresentando semelhanças, esses dois modos diferem-se quanto a natureza da fase extratora e a maneira de remoção da microgota no sistema. É muito utilizada para a extração e determinação de aditivos industriais em águas minerais, fluviais e para consumo humano^{36,41,43}.

Para o modo de operação *headspace* (HS-SDME), a microgota fica exposta acima da fase doadora, como exibido na figura 4 (f), onde as condições de equilíbrio entre as fases (fase doadora $\rightleftharpoons$ *headspace* $\rightleftharpoons$ fase extratora) sejam alcançadas, assim⁴¹:

$$C_{aq} \rightleftharpoons C_{HS} \rightleftharpoons C_{org} \quad (7)$$

E através da constante de distribuição (K_d) combinada com o balanço de massa do analito nas 3 fases, obtém-se a quantidade de analito na fase extratora⁴¹:

$$n_{org} = K_d = K_{org/aq} = \frac{K_{org/HS}}{K_{HS/aq}} \quad (8)$$

no qual:

n_{org} : quantidade do analito na fase extratora;

K_d : constante de distribuição;

$K_{org/aq}$: constante de distribuição do analito na fase extratora/fase doadora;

$K_{org/HS}$: constante de distribuição do analito na fase extratora/*headspace*;

$K_{HS/aq}$: constante de distribuição do analito no *headspace*/fase doadora

É muito empregada em análises de compostos voláteis e semi-voláteis, com características polares e apolares; sendo mais seletiva para solventes hidrofílicos. Como a microgota não está imersa na fase doadora, os parâmetros temperatura e agitação magnética podem ser aumentados em comparação a DI-SDME. Além disso, há a uma minimização dos interferentes e uma maior estabilidade da microgota^{41,43}.

A LLLME é o modo de operação trifásico como a HS-SDME. Neste caso, os analitos da fase doadora são extraídos para uma fase orgânica e depois para a fase extratora (microgota). A fase doadora está em contato com uma fase orgânica (área de interação) e a microgota é formada na fase orgânica, conforme a figura 4 (g). Para pequenos volumes uma retro-extração é necessária como nas extrações convencionais do tipo LLE^{36,41,45}. Tal qual (HS-SDME), a quantidade de analito extraído presente nas três fases, depende das constantes de equilíbrio fase doadora/fase orgânica e fase orgânica/fase aceptora³⁶. A LLLME é adequada para compostos orgânicos hidrofílicos e compostos que possuem características polares (fenóis, aminas, ácidos graxos), entre outros. A microgota (1-7 μL) é imersa em um filme estável de fase orgânica e agitado até 2000 rpm, apresentando elevados fatores de pré-concentração^{28,41}.

As pesquisas envolvendo a microextração em gota suspensa, tem tido um grande avanço nos últimos anos, principalmente no Brasil, no qual os modos de operação mais empregados são a imersão direta e *headspace*⁴¹.

1.4.1.2. HF-LPME

Baseada na LPME e representada na Figura 2, a microextração em fase líquida com fibras ocas, utiliza uma fibra polimérica porosa e oca preenchida com solvente orgânico. A fibra atua como uma barreira entre as fases e serve também, como suporte para a quantidade mínima de solvente extrator. Este modo de extração é denominado dinâmico, pois no interior da fibra é retirado ou preenchido com uma nova fase receptora. A fibra é composta de polipropileno sendo 70% da superfície porosa de diâmetro interno de 600 μm e tamanho do poro de 0,2 μm ^{46,47}.

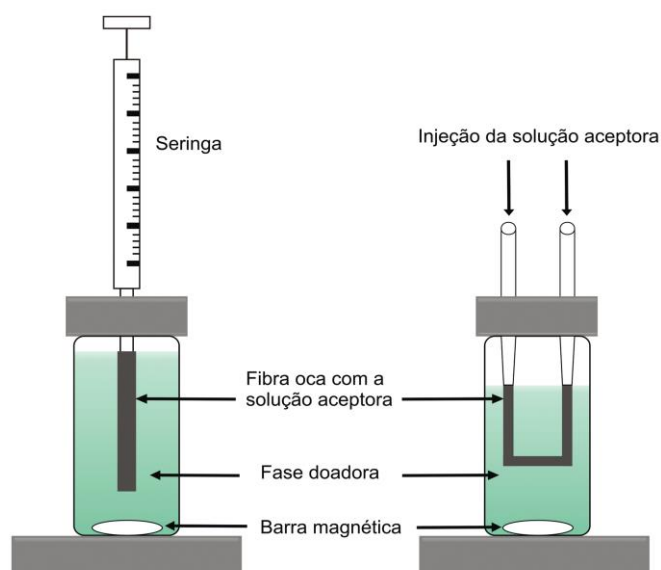


FIGURA 3 - Diferentes configurações para HF-LPME. Em (a) configuração em forma de haste; em (b) configuração em forma de U. Referência [28].

1.4.1.3. DLLME

Sendo um dos métodos de operação da LPME, esta técnica miniaturizada baseia-se no processo de partição dos analitos de interesse empregando pequenos volumes de uma mistura de solventes (dispensor e extrator), como mostra a Figura 1. A fase extratora imiscível com a amostra é dispersa em solução aquosa pelo auxílio de um solvente dispersivo e separada por centrifugação⁴⁷⁻⁴⁹.

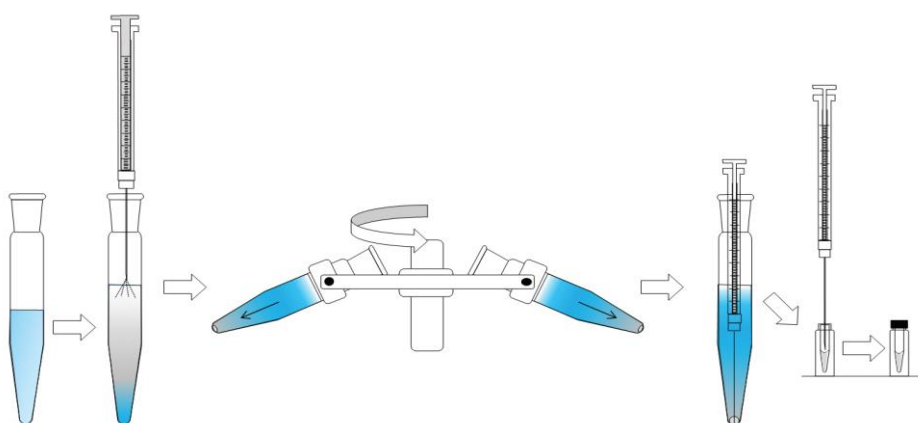


FIGURA 4 - Etapas da DLLME. Referência [48].

1.5. Parâmetros da SDME

Para obter resultados significativos no processo de extração utilizando esta técnica miniaturizada, deve ser observado e analisado os seguintes parâmetros: a escolha do solvente extrator, o volume da microgota, a temperatura do sistema, o tempo de extração, a velocidade de agitação e a adição de sal (*salting out*)^{31,33,50}.

1.5.1. Solvente Extrator

O solvente extrator escolhido para esta técnica, deve apresentar baixo ponto de ebulição e baixa solubilidade em solução aquosa. Os solventes orgânicos mais utilizados são o octanol, octano, decano, tolueno, undecano e nonano. É de fundamental importância a escolha correta do solvente extrator, pois a estabilidade e repetibilidade da microgota estarão garantidas^{28,41}.

Em extrações DI-SDME o melhor solvente orgânico para a fase extratora deve possuir elevado ponto de ebulição para não ocorrer a dissolução da microgota durante o processo de extração. Além disso, deve haver compatibilidade do mesmo no sistema de análise empregado (GC ou HPLC). Em extrações realizadas pelo método HS-SDME, o solvente extrator pode ser hidrofílico, pois não há um contato entre as fases (doadora e extratora)^{32,51}.

1.5.2. Volume da microgota

Este é um parâmetro que afeta significativamente o tempo e a eficiência da extração. Os volumes mais utilizados para formar a microgota variam entre 1,0 μL a 3 μL . Esses volumes irão depender da estabilidade e repetibilidade da microgota na extração²⁸.

De acordo com a equação 2, é possível investigar e avaliar a Influência do tamanho da microgota na quantidade de analito extraído sob determinadas condições em extrações SDME. O crescimento do volume da fase extratora (V_{org}) e da quantidade de analito presente (n_{org}), leva a uma diminuição na concentração da fase extratora (C_{org})^{36,41,43}. O aumento do volume, produz um aumento da área superficial

da microgota tornando-a menos estável, havendo uma modificação na velocidade e tempo de extração⁴¹.

Em análises realizadas em HPLC é necessário diluir a amostra antes da injeção, pois o pequeno volume da microgota acarreta uma perda da sensibilidade do equipamento, sendo mais apropriadas para GC, e a injeção de volumes maiores, acarreta formação de caudas nos picos cromatográficos^{36,43}.

1.5.3. Temperatura

Este parâmetro é fundamental no processo de extração SDME, pois afeta diretamente o equilíbrio entre as fases, havendo uma alteração nas constantes termodinâmicas do sistema. A temperatura deve ser controlada de tal forma que microgota não perca sua estabilidade. No modo de operação DI-SDME, a temperatura deve ser mais baixa quando comparada ao modo HS-SDME, pelo fato da fase extratora estar imersa na fase doadora. Temperaturas elevadas levam ao desprendimento da microgota ou a diminuição de seu volume³¹.

1.5.4. Tempo de Extração

O tempo de extração é aquele onde ocorre o equilíbrio do analito entre as fases. A microgota sofre alteração em sua estrutura quando permanece muito tempo no processo de extração prejudicando sua estabilidade e permanência na ponta da microseringa. Em um tempo pequeno, a transferência dos analitos da fase doadora para a extratora (microgota) é afetada^{37,39}.

Outro fator relacionado com o tempo de extração, é a variação dos resultados entre as análises. Quando o processo de extração ocorre pelo modo *headspace*, o equilíbrio rapidamente é alcançado, quando comparado aos outros modos de operação, devido ao coeficiente de difusão na fase de gás ser maior que na fase líquida e o aumento da velocidade de agitação magnética^{28,31,40}.

1.5.5. Velocidade de agitação

A velocidade de agitação, também é um fator que prejudica a estabilidade e permanência da microgota. Um aumento na velocidade de agitação irá reduzir o tempo de equilíbrio termodinâmico entre as fases, além do desprendimento da microgota e a formação de gotículas nas paredes do recipiente. É verificado uma maior velocidade de agitação para o modo HS-SDME pois a microgota não está imersa na fase doadora^{31,41}.

1.5.6. Adição de sal (*salting out*)

É um parâmetro muito empregado em alguns tipos de extrações, ocorrendo uma alteração na força iônica do meio, que influencia diretamente a solubilidade dos analitos. Na SDME, geralmente é observado uma diminuição na eficiência da extração, devido ao aumento da viscosidade causado pela dissolução do sal, que reduz a taxa de difusão dos analitos na fase aquosa (D_{aq}). Já em extrações no modo de operação HS-SDME, a adição de sal proporciona uma diminuição na solubilidade dos analitos em solução aquosa^{37,41}.

1.6. Aplicações da SDME

A SDME, tem sido empregada em diferentes matrizes alimentares e ambientais⁵⁰. Na Tabela 5, estão representadas algumas aplicações da SDME em diferentes matrizes e na tabela 6, diferentes técnicas de preparo de amostra utilizando a matriz caldo de cana.

TABELA 5 – Aplicações da SDME

MATRIZ	ANALITO	Modo SDME	ANÁLISE INSTRUMENTAL	LD	Ref
Adoçante	Ciclamato	HS-SDME	GC-FID	5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	[⁴¹]
Maionese	Compostos Voláteis Oxidativos	HS-SDME	GC-MS	0,008 0,021 ng g^{-1}	[⁴¹]
Água de coco e Vinho branco	Multiclasse Pesticidas	DI-SDME	GC-MS	0,1 0,88 $\mu\text{g L}^{-1}$	[³³]
Manga	Multiclasse Pesticidas	DI-SDME	GC-MS	0,14 169,20 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[³¹]
Peixe	Mentol como Anestésico	HS-SDME	GC-MS	0,021 $\mu\text{g L}^{-1}$	[⁵⁰]
Água	Trihalometano Halometano	DSDME	GC-ECD	0,059 0,137 $\mu\text{g L}^{-1}$	[⁵²]
Solo	Atrazina	DI-SDME	GC-MS	0,024 ng g^{-1}	[⁴¹]
Água e Soro humano	Estatina	LLL-SDME	HPLC-MS	0,09 13,0 ng g^{-1}	[⁴¹]

Na preocupação dos problemas gerados pelos pesticidas organoclorados ao ecossistema e a saúde humana e animal, houve a necessidade do desenvolvimento de uma metodologia analítica sensível, de baixo custo e eficiente para analisar possíveis contaminantes de organoclorados no caldo de cana^{10,39,51}. Verificou-se que a técnica de preparo de amostra SDME em qualquer modo de operação ainda não foi avaliada na matriz caldo de cana (Tabela 6). Adicionalmente, entre as publicações encontradas na literatura abordando agrotóxicos em caldo de cana, a maioria são oriundas da região Sudeste - principalmente do Estado de São Paulo.

É importante relatar que, até o prezado momento, no Estado do Mato Grosso do Sul nenhuma publicação abordando essa temática foi encontrada. Internacionalmente, encontrou-se publicações apenas em países como Índia e Malásia.

TABELA 6 – Diferentes técnicas de preparo de amostra empregadas na matriz caldo de cana

MATRIZ	ANALITO	TÉCNICA DE PREPARO DE AMOSTRA	ANÁLISE INSTRUMENTAL	LD	Ref
Caldo de cana	Pesticidas multiclasse	MEPS	GC-MS	0,3 1,5 µg L ⁻¹	[17]
Caldo de cana	Pesticidas multiclasse	Quechers	GC-ECD	30 40 µg L ⁻¹	[19]
Caldo de cana	Triazina	DLLME-SFO	GC-MS	0,037 0,008 µg L ⁻¹	[53]
Caldo de cana	neonicotinóide	Quechers	LC-MS/MS	0,7 2,0 µg L ⁻¹	[5]
Caldo de cana	Pesticidas multiclasse	SBSE	GC-MS	0,5 40 µg L ⁻¹	[10]

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinar resíduos de pesticidas organoclorados no caldo de cana por Microextração em gota suspensa - *Single drop microexctration* (SDME) como etapa no preparo de amostra e quantificação em Cromatografia Gasosa - *Gas chromatography* (GC) com Detector de Captura de Elétrons - *Eletronic Capture Detector* (ECD).

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e otimizar o método SDME-GC/ECD, avaliando parâmetros como, temperatura, volume da fase extratora (microgota), solvente extrator, tempo de exposição da microgota, velocidade de agitação e *efeito salting out*.
- Validar o método analítico desenvolvido, obedecendo os critérios da Coordenação Geral de Acreditação DOQ-CGCRE-008, revisão 07 de julho de 2018. Avaliando os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação.
- Aplicar o método otimizado e validado em amostras reais de caldo de cana disponíveis e comercializadas na cidade de Campo Grande – MS.

3.0. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Padrões e Reagentes

O padrão analítico de 1mL (2000 mg L⁻¹) adquirido na Sigma-Aldrich Supelco (Steinheim, Alemanha) nomeado SS TCL Pesticides Mix, contém os seguintes pesticidas organoclorados: α -BHC; γ -BHC; β -BHC; Heptacloro; δ -BHC; Aldrin; Heptacloro Epóxido Isomero; α -Endosulfan; Dieldrin; 4,4-DDE; Endrin; 4,4-DDD; β -Endosulfan; 4,4-DDT; Endrin Aldeído; Endosulfan Sulfato; Metoxicloro e Endrin Cetona numerados de 2 a 19. Suas estruturas e algumas propriedades físico-químicas, estão representadas na tabela 4 do item 1.3.2.

A solução foi preparada em hexano da HexiS Mallenckrodt (85%) numa concentração de 100 mg L⁻¹ e a partir dela as soluções trabalho foram obtidas em concentrações menores. Todas foram armazenadas e refrigeradas a 4°C para posteriormente serem utilizadas na fortificação das amostras de caldo de cana.

Para a formação da microgota foi utilizado os seguintes solventes orgânicos: isooctano 99% da Vetec, hexano 85% da HexiS Mallenckrodt, n-decano 99% da Tedia Company, tolueno 99,5% da Tedia Company, octanol da Sigma-aldrich 99%, 1-dodecanol da Sigma-Aldrich 98,0%, ciclo-hexano 99% da Labsynth, álcool benzílico 99% da Vetec, N,N-dimetil-formamida 99% da Sigma-aldrich e NaCl (99 – 100,5%) da Vetec.

3.2. Equipamentos e Materiais

- Varian Star 3600 CX Cromatógrafo gasoso com detector de captura de elétrons - ECD
- Agitador magnético da Fisoton modelo 752A
- Balança analítica FA2104N, Bioprecisa
- Sistema Milli Q, Gradient
- Estufa para esterilização e secagem TE397-2, Tecnal

- Ultrassom, Cristófoli Biossegurança
- Papel filtro
- Termômetro
- Béquer (5,10,15, 400mL), Uniglas
- Balão Volumétrico (5,10 mL), Uniglas
- Microseringa com cone de ponta 10 μ L, Hamilton
- Suporte com haste e garras
- Frascos (20 mL)
- Micropipetas (200, 1000 μ L)
- Pipetas (10 mL)
- Mini Agitador Magnético

3.3. Obtenção e Preparação das Amostras de Caldo de Cana

Amostras de caldo de cana foram coletadas em 5 pontos comerciais na cidade de Campo Grande – MS e refrigeradas a 4°C, até o momento das análises. Antes de cada extração, o caldo de cana passou por um processo de pré-tratamento, onde realizou-se a filtração, utilizando papel filtro, para a retirada de sólidos em suspensão.

A preparação das amostras deu-se através da adição de 1 mL de caldo de cana em 9 mL de água ultrapura. Na mesma proporção 1:9 as amostras foram fortificadas com a solução trabalho. Anteriormente a cada processo de extração, foi realizada a filtração do caldo de cana e as amostras homogeneizadas no ultrassom para a dispersão e desagregação de sólidos ainda presentes, para posteriormente formar a microgota, como ilustra a Figura 5.



FIGURA 5 – Formação da microgota no modo de operação DI-SDME em uma amostra de 1mL de caldo de cana filtrado + 9mL de água ultrapura. Homogeneizou-se a amostra. Referência: autor.

3.4. Microextração em gota suspensa (SDME)

Para o desenvolvimento do método, aplicou-se a técnica SDME nos modos HS-SDME e DI-SDME, representadas na figura 6 (a) e (b), respectivamente.

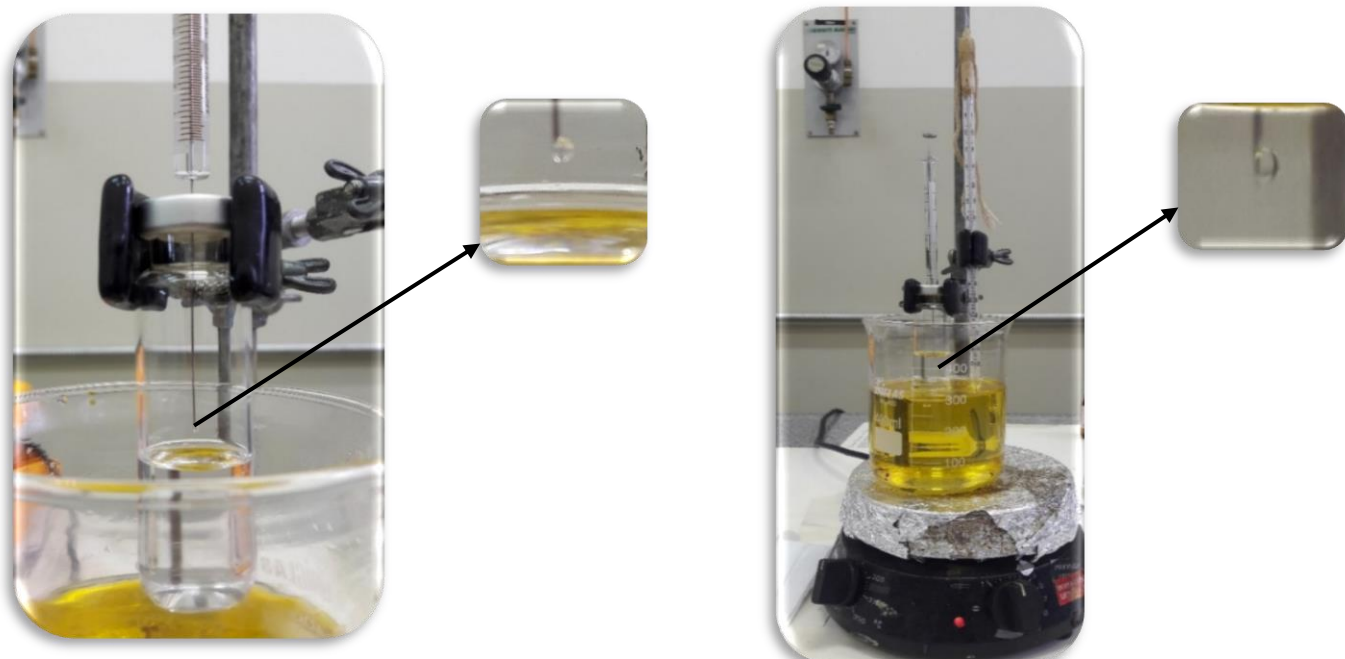


FIGURA 6 - Em (a) HS-SDME, a fase extratora (microgota) fica suspensa acima da fase doadora contendo os analitos e em (b) DI-SDME a fase extratora (microgota) é imersa na fase doadora contendo os analitos. Referência: autor.

3.4.1. HS-SDME

Para otimizar as condições experimentais deste modo de operação da SDME, foram avaliados, por meio de um processo univariado, os seguintes parâmetros:

- Solvente extrator: tolueno, octanol, dodecanol, álcool benzílico e N,N-dimetil-formamida.
- Volume da microgota: 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 μL .
- Temperatura: 50; 52; 55; 60; 75; 80°C.
- Tempo de extração: 15; 30; 40 min.
- Velocidade de agitação: 720; 1080; 1800 rpm.

A microgota de volume 1 μL foi formada no interior de um frasco de 20 mL sendo imerso em óleo para o controle da transferência de calor. Para formar a microgota foi utilizado uma microseringa de cromatografia gasosa de 10 μL , suspensa, acima da fase doadora como mostrada na figura 6 (a), através de uma agitação realizada por um agitador magnético e o controle constante do tempo e da temperatura. A fase extratora (microgota) foi puxada para o interior da microseringa e no mesmo instante injetada em um sistema de cromatografia gasosa acoplada ao detector de captura de elétrons (GC-ECD), para posterior análise. A limpeza da microseringa foi realizada utilizando 10 μL de heptano em triplicata, antes de cada extração.

Este procedimento, transcorreu primeiramente em 10 mL de água ultrapura para verificar o comportamento e as características da microgota. Subsequentemente, realizou-se um estudo de diluição da matriz caldo de cana com água ultrapura nas proporções de 5:5; 4:6; 3:7; 2:8 e 1:9 (v/v). Então, nas proporções de 1:9, cada amostra foi fortificada com 10 μL da solução trabalho a 5 mg L⁻¹ contendo os 18 pesticidas organoclorados citados no item 3.1.

3.4.2. DI-SDME

Para otimizar as condições experimentais deste modo de operação da SDME, foram avaliados, por meio de um processo univariado, os seguintes parâmetros:

- Solvente extrator: tolueno, isooctano, octanol, decano, hexano.

- Volume da microgota: 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 μL .
- Temperatura: 30; 35; 40; 47; 50°C
- Tempo de extração: 15; 30; 40 min.
- Velocidade de agitação: 180; 360; 540; 700; 1080 rpm
- Efeito *salting out*: adição de 5,10, 15% de NaCl e sem adição do sal.

A microgota de volume 1 μL foi formada no interior de um frasco de 20 mL e este frasco, imerso em óleo para o controle da transferência de calor. Para formar a microgota foi utilizado uma microseringa de cromatografia gasosa de 10 μL , imersa na fase doadora como representada na figura 6(b), através de uma agitação, realizada por um agitador magnético e o controle constante do tempo e da temperatura. A fase extratora (microgota) foi puxada para o interior da microseringa e no mesmo instante injetada em um sistema de cromatografia gasosa acoplada ao detector de captura de elétrons (GC-ECD), para posterior análise. A limpeza da microseringa foi realizada utilizando 10 μL de heptano em triplicata, antes de cada extração.

Este procedimento, transcorreu primeiramente em 10 mL de água ultrapura para verificar o comportamento e as características da microgota. Subsequentemente, realizou-se um estudo de diluição da matriz caldo de cana com água ultrapura nas proporções de 5:5; 4:6; 3:7; 2:8 e 1:9 (v/v). Então, nas proporções de 1:9, cada amostra foi fortificado com 10 μL da solução trabalho (0,3 – 100 mg L^{-1}) contendo os 18 pesticidas organoclorados citados no item 3.1.

3.5. Separação Cromatográfica

As análises cromatográficas dos pesticidas organoclorados na matriz caldo de cana, foram realizadas nas dependências do Laboratório de Combustíveis (LABCOM), localizado no Instituto de Química (INQUI) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) campus Campo Grande.

Após cada extração, a microgota (contendo o solvente extrator) foi injetada no cromatógrafo gasoso da Varian Star 3600, acoplado a um detector de captura

de elétrons (GC-ECD), utilizando o modo de injeção splitless. A temperatura utilizada para o detector e injetor foi de 250°C.

A separação cromatográfica se deu utilizando uma coluna capilar da Zebron ZB5MS nas dimensões (30mx0,25mmx0,25µm de espessura do filme), com fase estacionária composta por 5% Fenil e 95% polidimetilsiloxano (PDMS), com gás hélio (pureza de 99,999%) como gás de arraste sob um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. Estabeleceu-se a programação de temperatura do forno em: temperatura inicial: 60°C com rampa total de aquecimento até 150°C, seguida de uma rampa de 4.0°C.min⁻¹ mantida por 2,0 minutos até a temperatura final de 280°C seguida de rampa de 4.0°C.min⁻¹ mantida por 4,0 minutos, com tempo total da corrida cromatográfica 61,00 minutos.

3.6. Validação

Para confirmar a qualidade analítica dos resultados obtidos pelo método, realizou-se alguns procedimentos para a validação da metodologia proposta, segundo os critérios aceitos pela Coordenação Geral de Acreditação, DOQ-CGCRE-008, revisão 07–julho 2018, avaliando os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação.

3.6.1. Seletividade

Seletividade de um método é a capacidade em avaliar possíveis interferentes que possam estar ou não interferindo na determinação dos analitos em uma amostra complexa^{33,54,55}.

A avaliação da seletividade do método, foi verificada através da análise de uma amostra de caldo de cana não fortificada (branco) comparando com uma amostra fortificada, para observar a presença ou não de interferentes no tempo de retenção de saída dos picos cromatográficos dos pesticidas organoclorados detectados, que neste caso, compreendeu-se entre 30 a 50 minutos.

3.6.2. Linearidade

É a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais a concentração dos analitos presentes dentro de uma determinada faixa de aplicação^{33,54,55}.

A linearidade deste método foi verificada analisando-se amostras de caldo de cana (branco) fortificadas em 5 níveis de concentração (3; 10; 15; 20; 30 µg L⁻¹) em duplicata para cada nível de concentração.

As curvas de calibração, a média das áreas dos picos dos pesticidas organoclorados detectados, foram representadas em uma tabela, juntamente com a equação linear de regressão e o coeficiente de correlação (r).

A equação linear de regressão bem como o coeficiente de determinação (r²), foram obtidos através do método dos mínimos quadrados. O coeficiente angular e linear, representados por (b) e (a) respectivamente, foram obtidos em função da equação da reta representada na equação 9:

$$y = ax + b \quad (9)^{55}$$

Para realizar o cálculo do coeficiente de correlação (r) utilizou-se a equação 10, assim:

$$r^2 = \sqrt{r} \quad (10)^{55}$$

É considerado um (r) maior que 0,9900, para a linha de regressão, apesar de que para alguns órgãos regulamentadores, são aceitos valores maiores ou iguais a 0,90^{10,54}.

3.6.3. Precisão

A precisão é uma avaliação da reprodutibilidade das medidas. Geralmente ela é determinada pela repetição da medida em réplicas da amostra contendo os analitos de interesse. Em validações de metodologias analíticas, a precisão é considerada

em três níveis diferentes: repetitividade, reprodutibilidade e precisão intermediária. É usualmente expressa pelo desvio padrão ou coeficiente de variação⁵⁶⁻⁵⁸.

Neste estudo, a precisão foi avaliada em 5 níveis de concentração (3; 10; 15; 20; 30 µg L⁻¹) em duplicatas e expressa em termos de coeficiente de variação (CV%) de acordo com a equação 11:

$$CV = DPR = \frac{DP \times 100}{CMD} \quad (11)^{56}$$

onde

CV = coeficiente de variação (expresso em %)

DPR = desvio padrão relativo

DP = desvio padrão

CMD = concentração média determinada

Em métodos de análise de resíduos ou traços, são aceitos CV de até 30 %, dependendo da complexidade da amostra, atestando assim, a precisão do método⁵⁴.

3.6.4. Exatidão

É uma medida de quanto o valor encontrado através de experimentos se aproxima do valor verdadeiro (valor de referência). Para avaliar a exatidão de um método, os procedimentos mais utilizados são: comparação com os materiais de referência, ensaios de recuperação e ou adição de padrão. A exatidão é avaliada numericamente por meio da recuperação, representada pela equação 12⁵⁶⁻⁵⁸:

$$Rec (\%) = \frac{Xm \times 100}{Xr} \quad (12)^{56}$$

sendo:

Rec = recuperação em %

X_m = concentração medida

X_r = concentração real ou esperada

A exatidão do método foi avaliada por meio de ensaios de recuperação utilizando amostras de caldo de cana (branco) fortificadas com a solução trabalho contendo os pesticidas organoclorados, nas concentrações (3; 10; 15; 20; 30 µg L⁻¹), em duplicata. A recuperação foi determinada para cada organoclorado detectado nas concentrações citadas, utilizando a equação 12 e comparando com a Tabela 7.

TABELA 7 – Recuperação do analito em função da concentração

CONCENTRAÇÃO DO ANALITO (%)	RAZÃO DO ANALITO	UNIDADE	RECUPERAÇÃO (%)
100	1	100%	98-102
10	10 ⁻¹	10%	98-102
1	10 ⁻²	1%	97-103
0,1	10 ⁻³	0,1%	95-105
0,01	10 ⁻⁴	100 ppm	90-107
0,001	10 ⁻⁵	10 ppm	80-110
0,0001	10 ⁻⁶	1 ppm	80-110
0,00001	10 ⁻⁷	100 ppb	80-110
0,000001	10 ⁻⁸	10 ppb	60-115
0,0000001	10 ⁻⁹	1 ppb	40-120

Referência [54]

São considerados de menor teor, concentrações entre 0,01% e 1% e traços ou resíduos de analitos em concentrações menores que 0,01%. Os valores aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão compreendidos entre 40 a 120% ⁵⁶.

3.6.5. Limite de Detecção

O Limite de Detecção (LD) é a menor concentração da espécie de interesse que pode ser detectada pela técnica instrumental. Ele pode ser calculado através de 3 formas distintas: método visual, método da relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica⁵⁴.

No método visual, o cálculo do LD, é realizado através da análise de amostras contendo baixas e conhecidas concentrações dos analitos de interesse. O LD é considerado neste método como sendo a menor concentração detectada e diferente do ruído⁵⁹. Para a determinação do LD, foi utilizado o método visual.

3.6.6. Limite de Quantificação

O limite de Quantificação (LQ) de um procedimento analítico, é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis. Ele pode ser calculado através de 3 formas diferentes: método visual, método da relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica⁵⁴. Para a determinação do LQ, foi utilizado o método visual.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Separação Cromatográfica

Para a avaliação da separação cromatográfica representada na Figura 7, injetou-se 1µL da solução trabalho em concentração de (5 mg L⁻¹) contendo os 18 pesticidas organoclorados no equipamento GC com detector ECD, através do injetor no modo splitless. Para obter as condições cromatográficas descritas no item 3.5, alguns testes foram realizados. Foi utilizado a padronização externa para a quantificação dos mesmos, pela ordem na qual eluíram da coluna cromatográfica e pelo tempo de retenção.

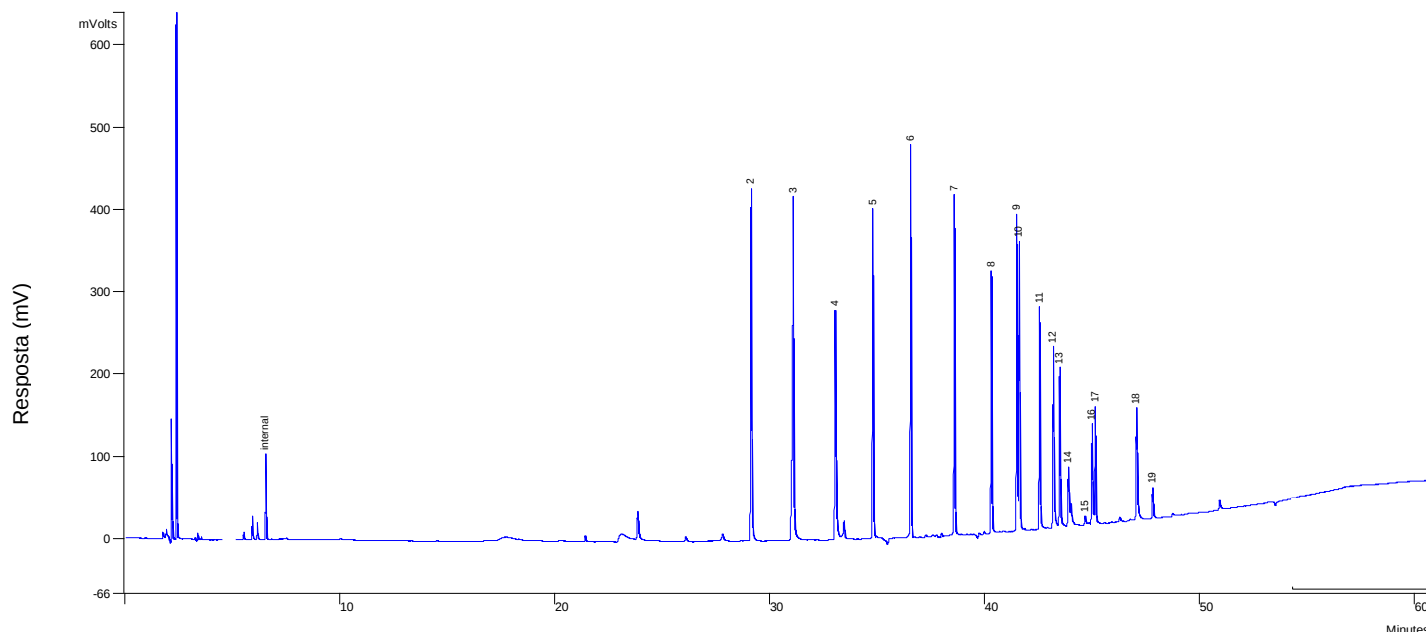


FIGURA 7 – Cromatograma obtido por GC-ECD da injeção de 1 μ L da solução trabalho contendo os 18 pesticidas organoclorados numa concentração de 5 mg L⁻¹. Os picos foram enumerados a partir do 2, sendo assim identificados: (2) α -BHC; (3) γ -BHC; (4) β -BHC; (5) Heptacloro; (6) δ -BHC; (7) Aldrin; (8) Heptacloro Epóxido Isomero; (9) α -Endosulfan; (10) Dieldrin; (11) 4,4-DDE; (12) Endrin; (13) 4,4-DDD; (14) β -Endosulfan; (15) 4,4-DDT; (16) Endrin Aldeído; (17) Endosulfan Sulfato; (18) Metoxicloro; (19) Endrin Cetona. Condições cromatográficas: Zebron ZB5MS (30mx0,25mmx0,25 μ m) operando a 60°C com rampa total de aquecimento até 150°C/ 2 min (4.0°C.min⁻¹) 280°C/ 4min (4.0°C.min⁻¹) com tempo total de corrida 61,00 min; temperatura do injetor 250°C (splitless) e temperatura do detector 250°C.

Realizou-se alguns testes, utilizando concentrações superiores a (5mg L⁻¹) da solução trabalho, de acordo com a Figura 8, havendo a extrapolação dos picos cromatográficos. Esta extrapolação se deu, devido a solução trabalho estar em uma concentração elevada para injeções utilizando o detector ECD, que é extremamente sensível aos compostos presentes.

Posteriormente, testes comparativos utilizando o detector FID (detector de ionização de chamas) foram realizados e verificou-se o ECD apresentou melhores resultados em termos de intensidade de sinal, pois é um detector seletivo para os analitos propostos neste projeto.

Na Figura 9, está representado um cromatograma obtido por GC-FID da injeção de 1 μ L (100 mg L⁻¹) da solução trabalho contendo os 18 pesticidas organoclorados.

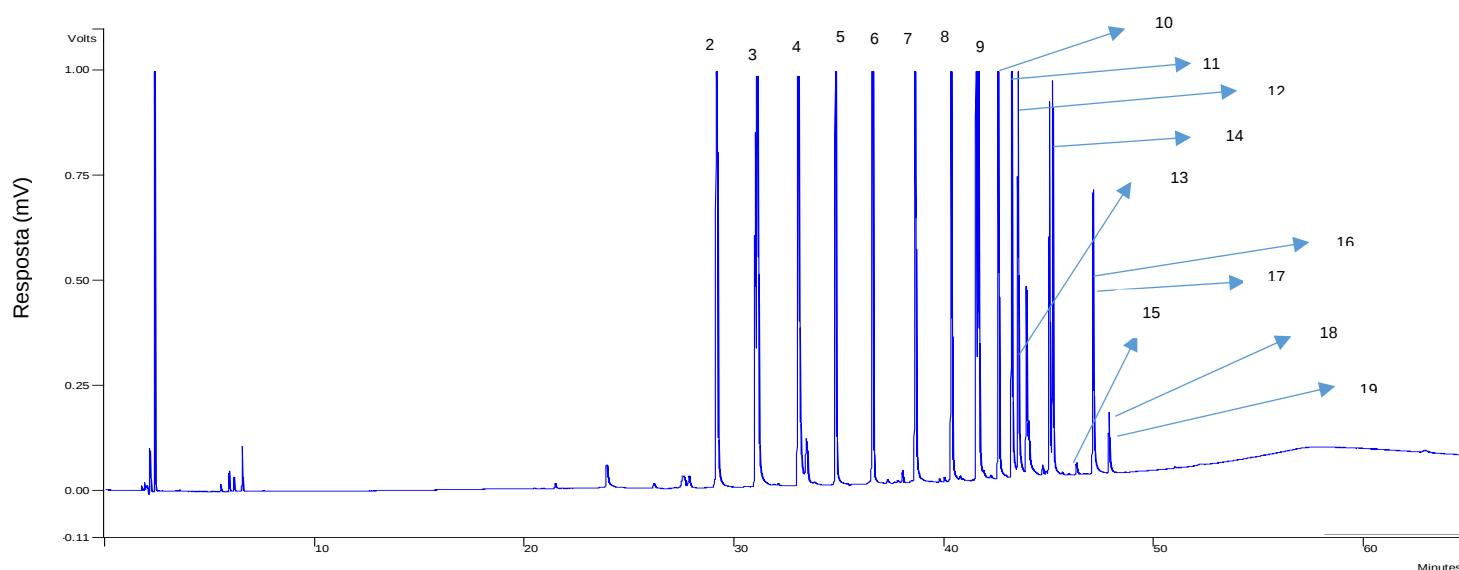


FIGURA 8 - Cromatograma obtido por GC-ECD da injeção de 1 μ L (10mg L⁻¹) da solução trabalho contendo os 18 pesticidas organoclorados. Os picos foram enumerados a partir do 2, sendo assim identificados: (2) α -BHC; (3) γ -BHC; (4) β -BHC; (5) Heptacloro; (6) δ -BHC; (7) Aldrin; (8) Heptacloro Epóxido Isomero; (9) α -Endosulfan; (10) Dieldrin; (11) 4,4-DDE; (12) Endrin; (13) 4,4-DDD; (14) β -Endosulfan; (15) 4,4-DDT; (16) Endrin Aldeído; (17) Endosulfan Sulfato; (18) Metoxicloro; (19) Endrin Cetona. Condições cromatográficas: Zebron ZB5MS (30mx0,25mmx0,25 μ m) operando a 60°C com rampa total de aquecimento até 150°C/2 min (4.0°C.min⁻¹) 280°C/4min (4.0°C.min⁻¹) com tempo total de corrida 61,00 min; temperatura do injetor 250°C (splitless) e temperatura do detector 250°C.

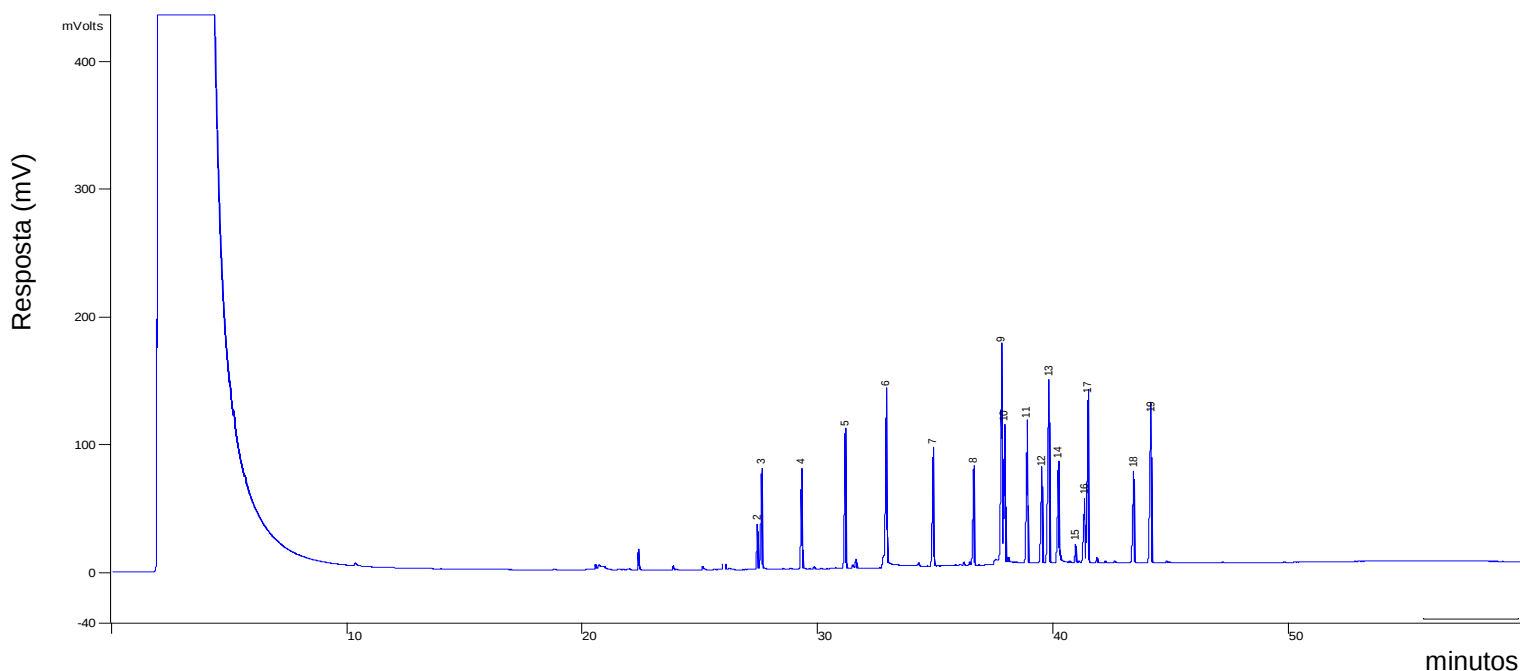


FIGURA 9 – Cromatograma obtido por GC-FID da injeção de 1 μ L (100mg L⁻¹) da solução trabalho contendo os 18 pesticidas organoclorados. Os picos foram enumerados a partir do 2, sendo assim identificados: (2) α -BHC; (3) γ -BHC;

(4) β -BHC; (5) Heptacloro; (6) δ -BHC; (7) Aldrin; (8) Heptacloro Epóxido Isomero; (9) α -Endosulfan; (10) Dieldrin; (11) 4,4-DDE; (12) Endrin; (13) 4,4-DDD; (14) β -Endosulfan; (15) 4,4-DDT; (16) Endrin Aldeido; (17) Endosulfan Sulfato; (18) Metoxicloro; (19) Endrin Cetona. Condições cromatográficas: Zebron ZB5MS (30mx0,25mmx0,25 μ m) operando a 60°C com rampa total de aquecimento até 150°C/2 min (4.0°C.min⁻¹) 280°C/4min (4.0°C.min⁻¹) com tempo total de corrida 61,00 min; temperatura do injetor 250°C (splitless) e temperatura do detector 250°C.

4.2. Otimização das condições experimentais da SDME

No processo de otimização do método de preparo de amostra, onde foi analisado a presença de 18 pesticidas organoclorados na matriz caldo de cana, os parâmetros (volume da microgota, solvente extrator, temperatura, tempo, velocidade de agitação e efeito *salting out*) foram avaliados através do processo univariado. Primeiramente, a microgota foi formada em 10 mL de água ultrapura para avaliar suas características e permanência na ponta da agulha da microseringa. Após este procedimento, iniciou-se a formação da microgota extratora na matriz caldo de cana após diluição com água ultrapura na proporção de 1:1 (5 mL de caldo de cana + 5 mL de água ultrapura). Devido a matriz possuir uma coloração escura, uma maior viscosidade e sólidos em suspensão, a microgota extratora não era estável e se desfazia antes do período de extração.

Assim, após estudo de diluição da matriz caldo de cana com água ultrapura nas proporções de 5:5; 4:6; 3:7; 2:8 e 1:9 (v/v), a proporção de 9 partes de água ultrapura e 1 parte de caldo de cana (para um volume final de 10 mL) foi a que demonstrou maior visibilidade e estabilidade da microgota extratora.

Por fim, para fins de extração, a amostra de 1 mL do caldo de cana foi fortificada com 10 μ L da solução trabalho, nas concentrações de 0,3-100 mg L⁻¹ contendo os seguintes organoclorados: α -BHC; γ -BHC; β -BHC; Heptacloro; δ -BHC; Aldrin; Heptacloro Epóxido Isomero; α -Endosulfan; Dieldrin; 4,4-DDE; Endrin; 4,4-DDD; β -Endosulfan; 4,4-DDT; Endrin Aldeido; Endosulfan Sulfato; Metoxicloro; Endrin Cetona e diluídos com água ultrapura até volume final de 10 mL.

A Tabela 8 e Tabela 9 sumariza o processo de otimização dos parâmetros da técnica SDME nos modos de operação HS-SDME e DI-SDME, respectivamente. Os desempenhos de cada parâmetro foram considerados pela estabilidade da microgota e pela resposta cromatográfica do equipamento GC-ECD.

TABELA 8 – Otimização dos parâmetros da HS-SDME

EXPERIMENTO	SOLVENTE EXTRATOR	VOLUME DA MICROGOTA (μ L)	TEMPERATURA ($^{\circ}$ C)	TEMPO DE EXTRAÇÃO (MINUTOS)	VELOCIDADE DE AGITAÇÃO (rpm)
PARÂMETROS AVALIADOS	tolueno octanol dodecanol álcool benzílico N,N-dimetil-formamida	1,0; 1,5; 2,0; 3,0	50; 52; 55; 60; 75; 80	15; 30; 40	720;1080; 1800
EXPERIMENTO 1	tolueno octanol dodecanol álcool benzílico N,N-dimetil-formamida	2,0	50	30	720
EXPERIMENTO 2	Dodecanol	1,0; 1,5; 2,0; 3,0	50	30	720
EXPERIMENTO 3	Dodecanol	1,0	50; 52; 55; 60; 75; 80	30	720
EXPERIMENTO 4	Dodecanol	1,0	80	15; 30; 40	720
EXPERIMENTO 5	Dodecanol	1,0	80	30	720;1080; 1800
MELHOR CONDIÇÃO	Dodecanol	1,0	80	30	1800

Tabela 9 – Otimização dos parâmetros da DI-SDME

EXPERIMENTO	SOLVENTE EXTRATOR	VOLUME DA MICROGOTA (µL)	TEMPERATURA (°C)	TEMPO DE EXTRAÇÃO (MINUTOS)	VELOCIDADE DE AGITAÇÃO (rpm)
PARÂMETROS AVALIADOS	tolueno, isooctano, octanol, decano hexano	1,0; 1,5; 2,0; 3,0	30; 35; 40; 47; 50	15; 30; 40	180; 360; 540; 700; 1080
EXPERIMENTO 1	tolueno, isooctano, octanol, decano hexano	2,0	30	15	180
EXPERIMENTO 2	Tolueno	1,0; 1,5; 2,0; 3,0	30	30	360
EXPERIMENTO 3	Tolueno	1,0	30; 35; 40; 47; 50	40	540
EXPERIMENTO 4	Tolueno	1,0	47	15; 30; 40	700
EXPERIMENTO 5	Tolueno	1,0	47	30	180; 360; 540; 700; 1080
MELHOR CONDIÇÃO	Tolueno	1,0	47	30	540

4.2.1. Solvente extrator

O solvente extrator escolhido deve garantir a eficiência na transferência de massa dos analitos para a fase extratora, preservando as características da microgota durante o tempo de extração^{29,41,43}. O desenvolvimento da técnica SDME

para a extração dos 18 pesticidas organoclorados no caldo de cana foi avaliado em dois modos de operação: HS-SDME e DI-SDME.

Os testes iniciais foram realizados utilizando 10 mL de água ultrapura para avaliação inicial do processo de extração. Posteriormente, os testes foram realizados na matriz através da diluição em 10 vezes da amostra de caldo de cana (adicionou-se 1 mL de caldo de cana em 9 mL de água ultrapura).

A escolha do solvente extrator mais adequado teve como base, a baixa solubilidade em água e a elevada solubilidade do analito no solvente orgânico em relação a solução aquosa, além disso, apresentar compatibilidade com o equipamento de análise⁴¹.

Desta maneira, realizou-se a extração pelo modo HS-SDME utilizando os seguintes solventes orgânicos formadores da microgota e que se encaixaram nas características citadas: tolueno, octanol, dodecanol, álcool benzílico e N,N-dimetilformamida. Devido a microgota ter permanecido suspensa no *headspace*, uma outra característica observada para este modo de operação é que o solvente extrator pode apresentar alta solubilidade em solução. Os solventes octanol, tolueno, álcool benzílico e N,N-dimetil-formamida, foram escolhidos com base na literatura e por demonstrarem uma boa estabilidade no modo headspace. Para o solvente extrator dodecanol, ocorreram alguns testes para avaliar o seu comportamento, devido não apresentar trabalhos utilizando este solvente. Dentre os solventes avaliados, o N,N-dimetilformamida e o dodecanol apresentaram melhor estabilidade na formação da microgota e quando 1µL foi injetado no GC-ECD o cromatograma obtido da resposta versus o tempo, está representado na Figura 10.

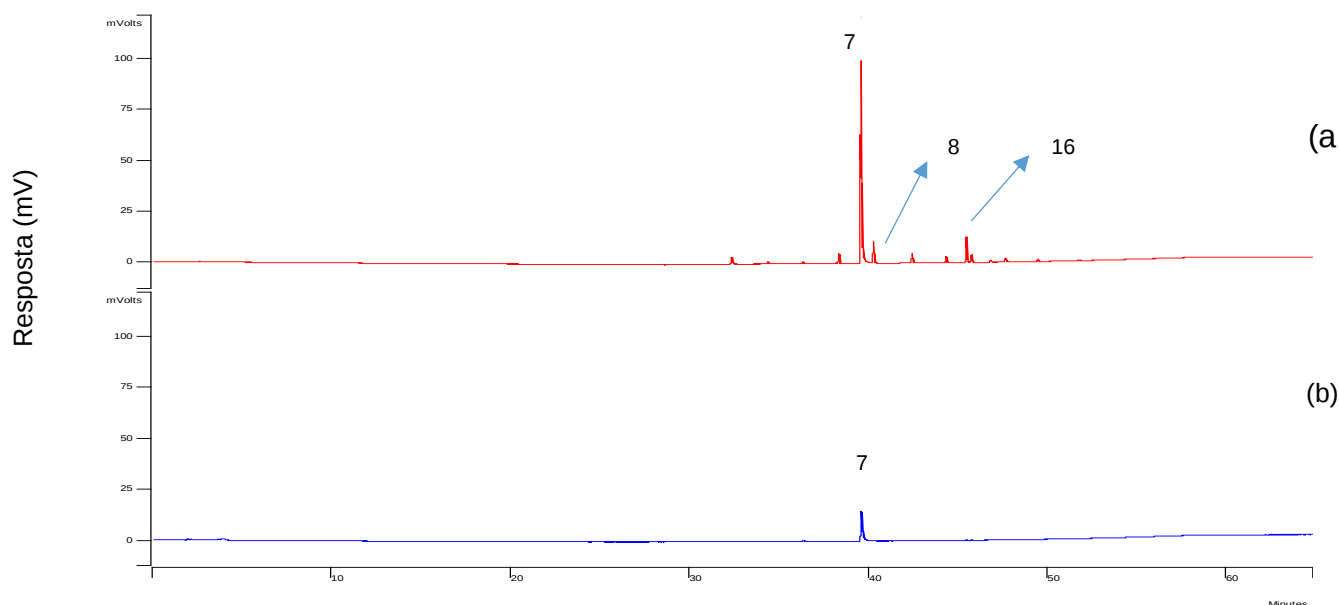


FIGURA 10 – Cromatograma obtido por GC-ECD da injeção de 1 μ L de uma extração realizada pelo modo de operação HS-SDME em uma amostra de: 1mL de caldo de cana + 9mL de água ultrapura + 10 μ L da solução trabalho contendo os 18 pesticidas organoclorados a 5 μ g L⁻¹. (a) solvente extrator – dodecanol. (b) solvente extrator - N,N-dimetil-formamida. Os picos foram enumerados a partir do 2, sendo assim identificados: (2) α -BHC; (3) γ -BHC; (4) β -BHC; (5) Heptacloro; (6) δ -BHC; (7) Aldrin; (8) Heptacloro Epóxido Isomero; (9) α -Endosulfan ; (10) Dieldrin; (11) 4,4-DDE; (12) Endrin; (13) 4,4-DDD; (14) β -Endosulfan; (15) 4,4-DDT; (16) Endrin Aldeído; (17) Endosulfan Sulfato; (18) Metoxicloro; (19) Endrin Cetona. Condições cromatográficas: Zebron ZB5MS (30mx0,25mmx0,25 μ m) operando a 60°C com rampa total de aquecimento até 150°C/ 2 min (4.0°C.min⁻¹) 280°C/ 4min (4.0°C.min⁻¹) com tempo total de corrida 61,00 min; temperatura do injetor 250°C (splitless) e temperatura do detector 25°C.

Observando os cromatogramas ilustrados na Figura 10(a)(b), onde a temperatura do modo HS-SDME foi de 80°C, percebeu-se que não houve uma boa transferência de massa entre a fase doadora e a fase extratora, evidenciando uma péssima eficiência nesta extração. Isto é devido a maioria dos organoclorados presentes na solução apresentarem altos pontos de ebulição, fazendo com que este modo, não seja o mais adequado para o desenvolvimento do método proposto. Assim, o modo de operação que se mostrou mais eficiente foi o DI-SDME.

Os solventes extratores utilizados pelo modo DI-SDME e que apresentaram estabilidade na formação da microgota e baixa solubilidade em solução são citados: tolueno, isooctano, octanol, decano e hexano. Ao comparar os solventes extratores usados com os da literatura, verificou-se que além dos citados, algumas bibliografias utilizaram o hexanol como solvente extrator. O solvente tolueno apresentou um melhor

comportamento neste modo de operação ocorrendo uma melhor transferência de massa entre as fases de acordo com a Figura 11. Os solventes extratores isooctano e hexano não demonstraram estabilidade suficiente para a formação e permanência da microgota na ponta da agulha da microseringa.

Além do tolueno realizar uma boa transferência de massa entre as fases doadora e extratora, ele é o mais utilizado nas técnicas SDME pelo modo DI-SDME em trabalhos científicos.

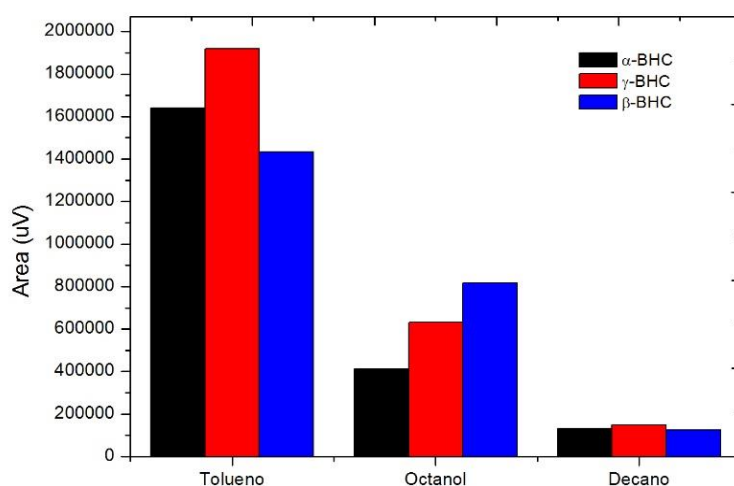


FIGURA 11 – Representação de uma extração no modo de operação DI-SDME utilizando diferentes solventes orgânicos na formação da microgota e otimizada sob os seguintes parâmetros: solvente extrator tolueno; volume da microgota 1 μ L; Temperatura 47°C tempo de extração 30 minutos; velocidade de agitação 540 rpm.

4.2.2. Volume da fase extratora

O volume da microgota afeta significativamente o tempo e a eficiência da extração. Os volumes mais utilizados variam entre 1 a 3 μ L devido a estabilidade e reprodutibilidade da microgota⁴¹. O efeito do volume da microgota na extração dos 18 pesticidas organoclorados no caldo de cana, foi avaliado através da estabilidade e reprodutibilidade da microgota, onde formada em 10 mL de água ultrapura avaliou-se suas peculiaridades, comportamentos e estabilidade sob as seguintes condições: solvente extrator tolueno; volume da microgota 1 μ L; Temperatura 47°C; tempo 30 minutos e velocidade de agitação 540 rpm. Subsequente, adicionou-se 1mL de

caldo de cana em 9 mL de água ultrapura e então fortificada com a solução trabalho do padrão contendo os 18 pesticidas organoclorados.

Os volumes avaliados (1,0; 1,5; 2,0; 3,0 μL) apresentaram grandes diferenças na estabilidade e permanência da microgota na ponta da microseringa para os dois modos de operação. Verifica-se que os volumes da microgota usados na literatura, não variam muito dos volumes usados para a formação da microgota deste projeto. Ao formar a microgota nos volumes (1,5; 2,0; 3,0 μL), observou-se que a mesma perdeu facilmente sua estabilidade e apresentou difícil manipulação, não sendo possível realizar sua injeção. Outra desvantagem em empregar volumes maiores é o aumento no tempo necessário para o sistema alcançar o equilíbrio devido a transferência de massa no interior da microgota ocorrer somente por difusão³⁹. Assim o volume de 1,0 μL apresentou maior estabilidade e permanência na extração, pois o aumento no volume torna a microgota mais pesada.

Em algumas extrações realizadas no modo de operação DI-SDME, o volume formado de 1 μL após permanecer 30 minutos imerso na amostra, foi puxado e verificado que ocorreu uma dissolução parcial da microgota diminuindo seu volume. Devido esta diminuição, a injeção desta microgota proporcionou uma diminuição na área dos picos cromatográficos. Verificou-se então, que esta diferença de volumes prejudicou a extração. Ocorre muitas vezes, que ao extrair a microgota para o interior do êmbolo da microseringa, um volume maior de sua formação é visualizado, assim, esta microgota se injetada poderá causar danos a coluna cromatográfica, ao equipamento instrumental e ainda a detecção de interferentes.^{29,41,52}. Nas extrações realizadas, este fato não foi verificado, pois todas as microgotas puxadas para o interior da microseringa que apresentaram volumes maiores de formação, foram descartadas.

Em extrações HS-SDME, a contaminação por interferentes oriundos das matrizes analisadas é menor quando comparada a DI-SDME, devido a microgota não estar imersa em solução⁴¹. Neste caso, pelo fato do elevado ponto de ebulição da maioria dos organoclorados presentes, este modo de operação não se adequou aos objetivos propostos para o desenvolvimento do método.

4.2.3.Temperatura

Para realizar uma extração SDME, é fundamental o controle da temperatura (agitação das moléculas) do sistema, pois sua oscilação afetará o equilíbrio entre as fases, alterando as constantes termodinâmicas⁴¹. A avaliação da energia cinética das moléculas deste sistema, ocorreu, formando a microgota em 10 mL de água ultrapura, para verificar o seu comportamento em um sistema contendo um frasco com a solução, inserida em um banho de óleo, havendo uma transferência de calor. Neste mesmo processo, a microgota foi formada em um frasco contendo 9 mL de água ultrapura adicionando 1mL de caldo de cana e fortificando com a solução trabalho contendo os organoclorados representados na tabela 4 do item 1.3.2.

A avaliação da temperatura na extração pelo modo HS-SDME, ocorreu empregando os seguintes valores na escala graus Celsius: 50; 52; 55; 60; 75; 80. Temperaturas maiores podem ser fornecidas devido a microgota estar suspensa no *headspace*²⁹. Verificou-se que o equilíbrio do sistema entre as 3 fases como ilustrado na Figura 4(f) do item 1.4.1.3 foi de 80°C. Este foi o limite de temperatura que a microgota permaneceu sem haver deformação. A partir deste valor, gotículas de ar se formavam nas paredes do recipiente, inviabilizando a avaliação visual da microgota conforme ilustrado na figura 12 que representa a imersão direta.

A avaliação deste parâmetro na extração executada pelo modo DI-SDME, utilizou as seguintes temperaturas: (30; 35; 40; 47; 50 °C). A microgota permaneceu estável sem deformações em uma temperatura de 47 °C. Foi nesta temperatura que ocorreu uma melhor transferência de massa entre as fases (doadora e receptora), atingindo o equilíbrio do sistema, como representado na Figura 4 (a) do item 1.4.1.3. Temperaturas menores que 47°C, foram avaliadas e apresentaram baixa transferência de massa entre as fases e consequentemente diminuição na área dos picos dos organoclorados na matriz caldo de cana como ilustrado na Figura 12.

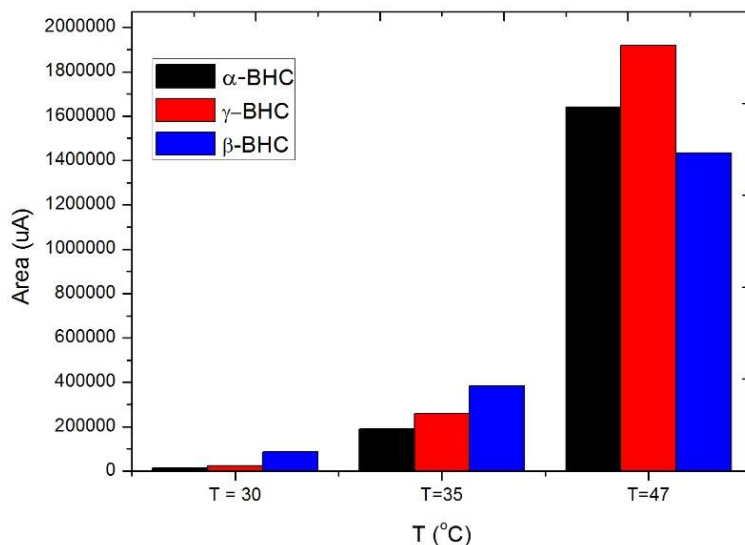


FIGURA 12 – Representação de uma extração no modo de operação DI-SDME utilizando diferentes temperaturas e otimizada sob os seguintes parâmetros: solvente extrator tolueno; volume da microgota 1 μ L; Temperatura 47°C tempo de extração 30 minutos; velocidade de agitação 540 rpm.

Temperaturas superiores a 47°C, há uma deformação e o desprendimento da microgota na ponta da agulha da microseringa, não sendo possível injetá-las no equipamento GC-ECD. Houve a formação de gotículas de ar nas paredes do recipiente que ao se desprenderem entravam em contato com a microgota aumentando seu volume e diminuindo a confiabilidade da extração, conforme ilustra a Figura 13.



FIGURA 13 – Extração DI-SDME em água ultrapura com elevação na temperatura e velocidade de agitação

Os trabalhos encontrados na literatura [30,33,39] que utilizaram a SDME, avaliaram o parâmetro temperatura na mesma variação utilizada para o desenvolvimento deste método, porém 47°C foi a temperatura limite para a estabilidade da microgota.

4.2.4.Tempo de extração

A SDME é uma técnica de equilíbrio onde é esperado que o aumento no tempo de extração proporcione aumento na massa de analito transferida da fase doadora para a fase extratora (microgota), atingindo seu máximo no momento do equilíbrio³⁹. A transferência de massa entre as fases doadora e extratora avaliada para o desenvolvimento deste método nos dois modos de operação, se deu sob 15, 30 e 40 minutos. A estabilidade da microgota é um fator que necessita ser avaliado para a escolha do tempo de extração³⁴. Para esta avaliação, testes foram realizados nos tempos citados e observado que 30 minutos foi o suficiente para a microgota permanecer estável e sem nenhuma deformação nos dois modos. Uma diminuição no tempo para 15 minutos, conforme ilustra a Figura 14, deixa evidente que neste tempo a transferência de massa entre as fases não foi suficientemente boa quando comparada ao tempo de 30 minutos.

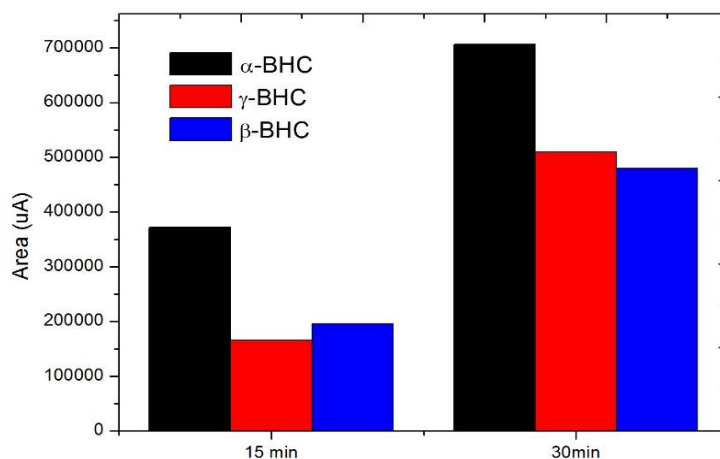


FIGURA14 – Representação de uma extração no modo de operação DI-SDME em diferentes tempos e otimizada sob os seguintes parâmetros: solvente extrator tolueno; volume da microgota 1 μ L; Temperatura 47°C; tempo de extração 30 minutos; velocidade de agitação 540 rpm.

O aumento no tempo para 40 minutos, proporcionou uma deformação na microgota, levado seu desprendimento e inviabilizando a extração.

O tempo de extração para a SDME segundo dados da literatura [30,33,39], ficou compreendido entre 15 a 30 minutos, mesma faixa utilizada para a realização das extrações deste projeto.

Apesar da utilização dos modos HS-SDME e DI-SDME para realizar a otimização do tempo de extração, o modo HS-SDME não foi viável para o desenvolvimento deste método devido ao elevado ponto de ebulição de alguns organoclorados.

4.2.5.Velocidade de agitação

O aumento na velocidade de agitação magnética aumenta a extração dos analitos e reduz o tempo necessário para o sistema atingir o equilíbrio. Assim como o tempo de extração, a velocidade de agitação deve ser avaliada considerando não só a eficiência na transferência de massa dos analitos da fase doadora para a fase extratora, mas também a integridade da microgota^{39,52}.

Para garantir uma boa qualidade na transferência dos analitos entre as 3 fases no modo HS-SDME, velocidades de agitação de 720; 1080; 1800 rpm, foram fornecidas amostra através de um agitador magnético. Como a microgota está suspensa no *headspace*, uma velocidade maior de agitação foi fornecida e compreendida em 1800 rpm. Realizou-se a extração e confirmou-se que mesmo em altas velocidades de agitação, a transferência de massa entre as fases doadora e receptora ficou comprometida devido ao elevado ponto de ebulição de alguns organoclorados presentes na amostra.

Ao formar a microgota no modo DI-SDME, as velocidades de agitação empregadas (180; 360; 540; 700; 1080 rpm) são fundamentais no processo de extração. Uma elevada velocidade de agitação, provoca deformações na microgota como o aumento em sua queda, seu deslocamento da ponta da agulha, diminuição em seu volume e o aparecimento de gotículas de ar nas paredes do recipiente e na agulha^{39,41,50}. Isso foi verificado quando a velocidade de agitação usada foi maior

que 540 rpm, representado na figura 13. Notou-se que as gotículas de ar eram facilmente atraídas para a microgota, aumentando instantaneamente seu volume e desestabilizando-a. Para velocidades menores (180; 360 rpm) a transferência dos analitos da fase doadora para a extratora não foi tão eficiente quando comparada com os experimentos realizados com velocidade de agitação de 540 rpm e representados na Figura 15.

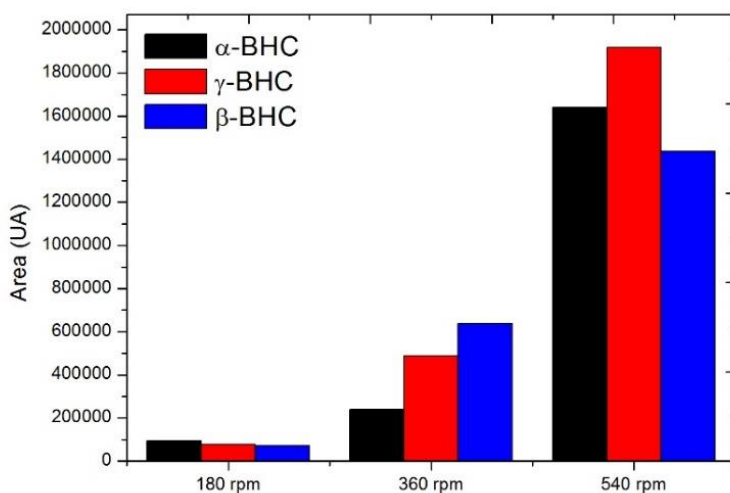


FIGURA15– Representação de uma extração no modo de operação DI-SDME utilizando diferentes velocidades de agitação e otimizada sob os seguintes parâmetros: solvente extrator tolueno; volume da microgota 1μL; Temperatura 47°C; tempo de extração 30 minutos; velocidade de agitação 540 rpm.

Alguns trabalhos reportados da literatura [^{29–31,33}], utilizaram velocidades de agitação entre 200 e 570 rpm, para diferentes matrizes e analitos.

4.2.6. Efeito salting out

O efeito *salting out* está relacionado com a interação entre a água e o sal, reduzindo a solvatação das moléculas na solução aquosa e consequentemente a coesão da água devido as fortes interações com os dipolos, promovendo uma mudança no equilíbrio de partição dos solutos orgânicos neutros em direção a fases não aquosas e facilitando a extração dos analitos⁴¹. Sendo assim, para avaliar o efeito *salting out* na eficiência da extração DI-SDME, foi adicionado uma quantidade de 5,

10 e 15% de NaCl, nas amostras fortificadas, auxiliando a transferência de massa entre as fases (doadora e extratora), melhorando assim a eficiência da extração conforme ilustra a Figura 16. A fase doadora é formada por: 1 mL de caldo de cana + 9 mL de água ultrapura + 10 µL da solução padrão. A adição do sal, melhora a eficiência da extração, porém neste caso, prejudicou a estabilidade, permanência e visibilidade da microgota, principalmente quando foi adicionado 15% de NaCl, não permanecendo 10 minutos na ponta da microseringa. Observou-se a presença de alguns cristais de sal que não solubilizaram, mesmo a amostra sendo homogeneizada no ultrassom. Por este motivo, é mais difícil a microgota permanecer na ponta da microseringa imersa em solução.

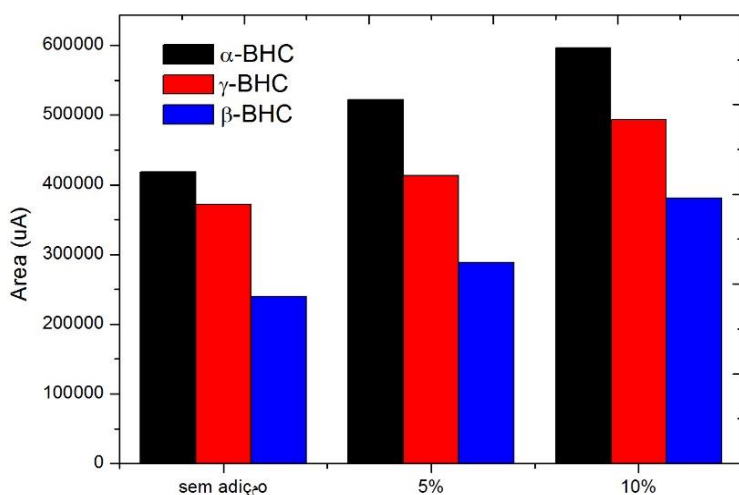


FIGURA16– Representação de uma extração no modo de operação DI-SDME através da adição de NaCl (5;10%) e otimizada sob os seguintes parâmetros: solvente extrator tolueno; volume da microgota 1µL; Temperatura 47°C; tempo de extração 30 minutos; velocidade de agitação 540 rpm.

4.3. Desempenho analítico do método

O comportamento da extração SDME pelos modos HS-SDME e DI-SDME otimizados foi avaliado na análise de 18 pesticidas organoclorados, iniciando a numeração pelo 2, assim: (2) α -BHC; (3) γ -BHC; (4) β -BHC; (5) Heptacloro; (6) δ -BHC; (7) Aldrin; (8) Heptacloro Epóxido Isomero; (9) α -Endosulfan ; (10) Dieldrin; (11) 4,4-DDE; (12) Endrin; (13) 4,4-DDD; (14) β -Endosulfan; (15) 4,4-DDT; (16)

Endrin Aldeído; (17) Endosulfan Sulfato; (18) Metoxicloro; (19) Endrin Cetona, na matriz caldo de cana.

Para a avaliação do método proposto, foram aplicados os parâmetros de: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), seguindo as recomendações da Coordenação Geral de Acreditação DOQ-CGCRE-008, revisão 07 de julho de 2018.

4.3.1. Seletividade

A seletividade do método foi determinada submetendo amostras de caldo de cana, com e sem a adição dos organoclorados citados no item 4.3, ao método desenvolvido. Nas condições cromatográficas empregadas, evidenciou-se que as amostras injetadas do branco e de uma amostra fortificada com $30\mu\text{g L}^{-1}$ da solução trabalho contendo os 18 pesticidas organoclorados não apresentou interferentes nos tempos de retenção dos pesticidas organoclorados, os quais podem ser observados na Figura 17 (a)(b). Isto comprova a seletividade do método analítico.

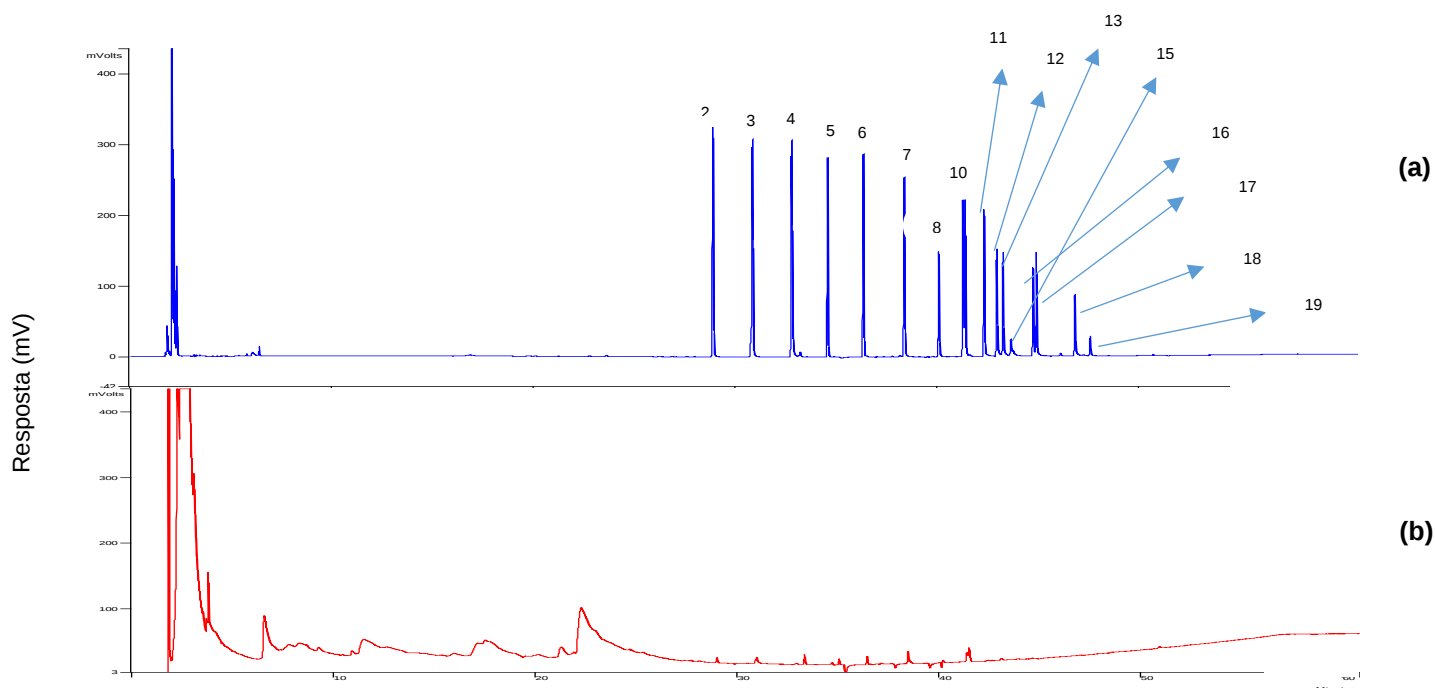


FIGURA 17 – (a) Cromatograma obtido por GC-ECD da injeção de $1\mu\text{L}$ de uma extração realizada pelo modo de operação DI-SDME em uma amostra de: 1mL de caldo de cana + 9mL de água ultrapura, fortificada com $10\mu\text{g L}^{-1}$ ($30\mu\text{g L}^{-1}$) da solução trabalho contendo os 18 pesticidas organoclorados. Os picos foram

enumerados a partir do 2, sendo assim identificados: (2) α -BHC; (3) γ -BHC; (4) β -BHC; (5) Heptacloro; (6) δ -BHC; (7) Aldrin; (8) Heptacloro Epóxido Isomero; (9) α -Endosulfan; (10) Dieldrin; (11) 4,4-DDE; (12) Endrin; (13) 4,4-DDD; (14) β -Endosulfan; (15) 4,4-DDT; (16) Endrin Aldeído; (17) Endosulfan Sulfato; (18) Metoxicloro; (19) Endrin Cetona. **(b)** Cromatograma obtido por GC-ECD da injeção de 1 μ L de uma extração realizada pelo modo de operação DI-SDME em uma amostra de: 1mL de caldo de cana + 9mL de água ultrapura não fortificada. Condições cromatográficas: Zebron ZB5MS (30mx0,25mmx0,25 μ m) operando a 60°C com rampa total de aquecimento até 150°C/ 2 min (4.0°C.min⁻¹) 280°C/ 4 min (4.0°C.min⁻¹) com tempo total de corrida 61,00 min; temperatura do injetor 250°C (splitless) e temperatura do detector 250°C.

4.3.2. Linearidade

Através da construção das curvas analíticas, foi possível avaliar a linearidade do método pela estimativa dos coeficientes de determinação referentes as equações das curvas, obtidas pelo método de regressão linear. Neste trabalho, dos 18 pesticidas organoclorados analisados, foi possível avaliar os parâmetros para 9 analitos: α -BHC; γ -BHC; β -BHC; δ -BHC; Aldrin; Dieldrin; 4,4-DDT; Endosulfan Sulfato e Metoxicloro. A Tabela 10, apresenta o coeficiente de correlação (r) dos 9 organoclorados detectados no qual variou entre 0,956 a 0,991.

TABELA 10 - Equações das retas e coeficientes de correlação (r) obtidos a partir das curvas analíticas dos pesticidas organoclorados detectados

Pico	Organoclorado	Faixa de trabalho (μ g L ⁻¹)	Equação	r
2	α -BHC	3 - 30	y = 522470x + 43913	0,991
3	γ -BHC	3 - 30	y = 521692x + 85003	0,960
4	β -BHC	3 - 30	y = 561279x - 14012	0,980
6	δ -BHC	10 - 30	y = 48493x - 21986	0,965
7	Aldrin	10 - 30	y = 154949x - 124640	0,984
10	Dieldrin	10 - 30	y = 95062x - 11863	0,956
15	4,4-DDT	10 - 30	y = 201144x - 160555	0,970
17	Endosulfan Sulfato	10 - 30	y = 225727x - 182129	0,971
18	Metoxicloro	10 - 30	y = 184848x - 131332	0,981

4.3.3. Precisão

A precisão para este método foi avaliada através da repetibilidade, estimado pelo valor do coeficiente de variação (CV), obtido após análises executadas em duplicatas ($n=2$), utilizando a precisão intermediária. Foram avaliadas as áreas dos picos obtidos pela injeção das soluções trabalho contendo os organoclorados em 5 níveis de concentração: 3; 10; 15; 20; 30 $\mu\text{g L}^{-1}$. Dos 9 organoclorados quantificados, a precisão para (α -BHC, γ -BHC e β -BHC) foi avaliada numa faixa de trabalho de 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ - 30 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto para os outros, de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ - 30 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Pelos resultados obtidos utilizando a equação 11 e representados na Tabela 11, os CV numa concentração de 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram de: 12% (α -BHC); 1,9 % (γ -BHC) e 0,25% (β -BHC). Para os outros organoclorados detectados os CV variaram de 0,3% (α -BHC) a 16,5% (δ -BHC), em concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$; de 0,10% (α -BHC) a 15,6% (endosulfan sulfato), em concentração de 15 $\mu\text{g L}^{-1}$; de 2,0% (dieldrin) a 19,5% (endosulfan sulfato), em concentração de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$; de 0,19% (aldrin) a 19% (metoxicloro), em concentração de 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para o 4,4-DDT 26,7%. Para os demais organoclorados, não foram obtidos valores consideráveis para o menor nível de concentração, assim, não foi apresentado.

Devido a complexidade do tipo de extração empregada, da da matriz e a baixa concentração analisada, quando comparada com [54], o método desenvolvido apresentou uma precisão satisfatória para os pesticidas organoclorados detectados na matriz caldo de cana, apresentando um CV abaixo de 30%.

TABELA 11 – Média das áreas dos picos e coeficientes de variação obtidos para cada pesticida organoclorado detectado na avaliação da precisão do método

PICOS	ORGANOCOLORADO	3 µg L ⁻¹		10 µg L ⁻¹		15 µg L ⁻¹		20 µg L ⁻¹		30 µg L ⁻¹	
		M.A.	CV (%)	M.A.	CV (%)	M.A.	CV (%)	M.A.	CV (%)	M.A.	CV(%)
2	α-BHC	263432	12,0	451074	0,3	874839	0,10	1079141	8,3	1626347	14,0
3	γ-BHC	416976,5	1,9	348537,5	6,5	898783	10,5	1124082,5	11,3	1705835	12,9
4	β-BHC	227235	0,25	403719	11,6	771779,5	13,2	1283105	16,7	1622080	14,3
6	δ-BHC	-	-	16742	16,5	66838,5	3,4	70402,5	3,8	121770,5	2,7
7	Aldrin	-	-	53586	2,3	93402	7,0	160273	11,0	356293	0,19
10	Dieldrin	-	-	59934	17,0	142159,5	2,8	207646,5	2,0	255772,5	12,0
15	4,4-DDT	-	-	69055	6,7	146029	8,8	177500	16,4	473777,5	26,4
17	Endosulfan Sulfato	-	-	17131,5	6,0	220188,5	15,6	226666,5	19,5	500449	8,0
18	Metoxicloro	--	-	73997	9,6	148102,5	14,0	194156,5	14,4	444774,5	19,0

M.A.- média das áreas; CV - coeficiente de variação; n = 2 ;

4.3.4. Exatidão

A exatidão deste método foi avaliada por meio de ensaios de recuperação utilizando a fórmula 12 do item 3.6.4 para cada organoclorado detectado na faixa de concentração: 3; 10; 15; 20; 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ em amostras de caldo de cana. Na Tabela 12, estão representados os resultados da recuperação das amostras de caldo de cana fortificadas com os pesticidas organoclorados.

TABELA 12 – Recuperação dos organoclorados detectados em amostras de caldo de cana

PICO	ORGANOCOLORADO	RECUPERAÇÃO (%) CONCENTRAÇÃO ADICIONADA ($\mu\text{g L}^{-1}$)				
		3	10	15	20	30
2	α -BHC	66	56	55	54	53
3	γ -BHC	55	60	58	56	52
4	β -BHC	51	54	55	55	55
6	δ -BHC	-	26	50	37	41
7	Aldrin	-	30	71	92	113
10	Dieldrin	-	83	87	89	91
15	4,4-DDT	-	40	94	120	147
17	Endosulfan Sulfato	-	44	104	134	165
18	Metoxicloro	-	53	97	119	141

A recuperação dos organoclorados detectados a nível de resíduos ou traços, na matriz caldo de cana comparando com os valores de referência representados na Tabela 7 do item 3.6.4, compreende 40% a 120%. Para os organoclorados (δ -BHC) e (Aldrin) que tiveram uma recuperação menor que os valores de referência, possivelmente houve uma maior afinidade pela fase doadora, havendo a dificuldade na migração da fase doadora para a extratora (microgota). Os organoclorados que apresentaram valores de recuperação acima dos de referência, possuem uma maior afinidade com a fase extratora e consequentemente melhor extração. Outro fator que pode ter influenciado nos resultados, foi a instabilidade no sinal produzido pelo detector ECD e a não utilização da padronização interna.

4.3.5. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção LD e quantificação LQ deste método, foram determinados pelo método visual. As amostras de caldo de cana foram fortificadas com a solução trabalho contendo os 18 pesticidas organoclorados, nas seguintes concentrações (3; 10; 15; 20; 30 $\mu\text{g L}^{-1}$). A Tabela 13 apresenta os LD e LQ dos 9 organoclorados detectados e suas variações.

TABELA 13 – Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos 9 organoclorados detectados

PICO	ANALITO	FAIXA DE TRABALHO ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
2	α -BHC	3,0 – 30,0	0,5	1,0
3	γ -BHC	3,0 – 30,0	0,5	1,0
4	β -BHC	3,0- 30,0	0,5	1,0
6	δ -BHC	10,0 – 30,0	1,0	3,0
7	Aldrin	10,0 – 30,0	1,0	3,0
10	Dieldrin	10,0 – 30,0	1,0	3,0
15	4,4-DDT	10,0 – 30,0	1,0	3,0
17	Endosulfan Sulfato	10,0 – 30,0	1,0	3,0
18	Metoxicloro	10,0 – 30,0	1,0	3,0

4.4. Análise Comparativa

Na realização deste projeto, utilizou-se a técnica SDME para a extração dos 18 pesticidas organoclorados no caldo de cana, onde 9 foram identificados e quantificados através da área de cada pico cromatográfico. Desenvolveu-se a extração nos dois modos de operação HS-SDME e DI-SDME, onde o modo HS-SDME não demonstrou eficiência, devido ao alto ponto de ebulição dos organoclorados, assim, somente otimizada. O modo DI-SDME foi otimizado e desenvolvido, pois demonstrou eficiência no processo de extração na matriz caldo de cana.

Comparando a extração realizada com as demais, apresentadas na Tabela 14, que foram realizadas por diferentes técnicas miniaturizadas, distintos analitos e

análises instrumentais; foi observado que os valores dos (LD) encontrados pelo método visual de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para os organoclorados (α -BHC; γ -BHC; β -BHC), de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ para os organoclorados (δ -BHC; Aldrin; Dieldrin; 4,4-DDT; Endosulfan Sulfato; Metoxicloro) , foram resultados que representaram a eficiência do modo DI-SDME na extração dos analitos citados na matriz caldo de cana. Este modo utiliza microlitros de solvente extrator, é simples, de baixo custo e não precisa ser automatizado, estando dentro dos princípios da Química Verde.

TABELA 14 - Diferentes técnicas de preparo de amostra empregadas na matriz caldo de cana

MATRIZ	ANALITO	TÉCNICA DE PREPARO DE AMOSTRA	ANÁLISE INSTRUMENTAL	LD	Ref
Caldo de cana	Pesticidas Multiclasse	MEPS	GC-MS	0,3 $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$	[17]
Caldo de cana	Pesticidas Multiclasse	Quechers	GC-ECD	30 $40 \mu\text{g L}^{-1}$	[19]
Caldo de cana	Triazina	DLLME-SFO	GC-MS	0,037 $0,008 \mu\text{g L}^{-1}$	[53]
Caldo de cana	Neonicotinóide	Quechers	LC-MS/MS	0,7 $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$	[5]
Caldo de cana	Pesticidas Multiclasse	SBSE	GC-MS	0,5 $40 \mu\text{g L}^{-1}$	[10]
Caldo de cana	Pesticidas organoclorados	SDME	GC-ECD	0,5 $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$	Este trabalho

4.5. Aplicação em amostras reais de Caldo de Cana

As amostras de caldo de cana foram coletadas em 5 diferentes pontos comerciais na cidade de Campo Grande- MS. A Tabela 15, mostra os resultados obtidos utilizando o modo de operação DI-SDME nas amostras. Verifica-se que dos 5

pontos coletados, 4 apresentaram sinais de organoclorados. A aplicação deste tipo de pesticidas de origem orgânico sintética, é proibida segundo a Lei 7802/89, não possuindo então, Limite Máximo de Resíduo-LMR em alimentos e bebidas.

TABELA 15 – Aplicação da SDME no modo de operação DI-SDME em amostras de caldo de cana

AMOSTRA	PESTICIDAS ORGANOCORADOS	LIMITE DE DETECÇÃO (LD)
AMOSTRA 1	α -BHC	<LD
	γ -BHC	>LD
	β -BHC	<LD
AMOSTRA 2	α -BHC	>LD
	γ -BHC	>LD
	β -BHC	<LD
	Dieldrin	>LD
AMOSTRA 3	α -BHC	>LD
	β -BHC	<LD
AMOSTRA 4	α -BHC	>LD
	γ -BHC	>LD
	4,4-DDT	>LD
	Endosulfan Sulfato	>LD

5.0. CONCLUSÃO

Após avaliar os vários modos de operação da SDME na literatura, constatou-se que a maioria dos trabalhos para diferentes analitos e matrizes, utilizavam a HS-SDME e a DI-SDME, por serem modos mais simples. Os dois modos foram avaliados e para cada um deles utilizou-se diferentes solventes extratores. Nas extrações realizadas pelo modo HS-SDME, os solventes extratores que melhor se adequaram foram o dodecanol e a N,N-dimetil-formamida porém apresentaram pouca eficiência no processo de extração, devido ao elevado ponto de ebulição dos organoclorados. Para o modo DI-SDME, o solvente extrator que demonstrou melhor eficiência no processo foi o tolueno. Realizando uma comparação dos dois modos, verificou-se que o DI-SDME foi o mais adequado na extração dos pesticidas organoclorados na matriz caldo de cana.

O método proposto foi validado segundo os critérios aceitos pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) avaliando os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação. Dos 18 pesticidas organoclorados estudados, 9 (α -BHC; γ -BHC; β -BHC, δ -BHC; Aldrin, Dieldrin, 4,4-DDT, Endosulfan Sulfato; Metoxicloro) foram identificados e quantificados nas amostras de caldo de cana coletadas em diferentes pontos na cidade de Campo Grande – MS. Os resultados obtidos para estes organoclorados foram satisfatórios para a faixa de trabalho avaliada de 3 a 30 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A instabilidade do detector ECD e a ausência de padronização interna prejudicaram a quantificação de alguns pesticidas organoclorados contidos na solução trabalho, assim citados: (5) Heptacloro; (8) Heptacloro Epóxido Isomero; (9) α -Endosulfan; (11) 4,4-DDE; (12) Endrin; (13) 4,4-DDD; (14) β -Endosulfan; (16) Endrin Aldeído; (19) Endrin Cetona. Assim sendo este método pode ser aplicado para determinar resíduos de pesticidas organoclorado no caldo de cana.

6.0. PERSPECTIVAS FUTURAS

Utilizar o conhecimento adquirido nesse projeto e aplicar método DI-SDME na análise de agrotóxicos organoclorados em outras matrizes.

7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bergamin Lima, R. *et al.* Sugarcane cells as origin of acid beverage floc in cane sugar. *Food Chem.* **237**, 1004–1011 (2017).
2. Oliveira, T. V. de. CANA-DE-AÇUCAR. (2013).
3. Santoro, E., Soler, E. M. & Cherri, A. C. Route optimization in mechanized sugarcane harvesting. *Comput. Electron. Agric.* **141**, 140–146 (2017).
4. Hamerski, F. Estudo De Variáveis No Processo De Carbonatação Do Caldo De Cana-De-Açúcar. 149 (2009).
5. Suganthi, A., Bhuvaneswari, K. & Ramya, M. Determination of neonicotinoid insecticide residues in sugarcane juice using LCMSMS. *Food Chem.* **241**, 275–280 (2018).
6. Prati, P. & Camargo, G. A. Características Do Caldo De Cana E Sua Influência Na Estabilidade Da Bebida Characteristics of Sugarcane Juice and Your Influence in the Bev- Erage Stability. *Bioengenharia (Campinas)* **2**, 37–44 (2008).
7. Araújo, E. da S. & Santos, J. A. P. O desenvolvimento da cultura da cana-de-açúcar no Brasil e sua relevância na economia nacional. *Igarss 2014* 1–5 (2014). doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2
8. Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnológicos. Guia da cana-de-açúcar. *Cons. Informação sobre Biotecnol.* 20 (2009).
9. Superior, C. *et al.* Desenvolvimento de caldo de cana desidratado. (2012).
10. Barletta, J. Y. Desenvolvimento e Aplicação de uma nova fase para Extração por Sorção em Barra de Agitação (SBSE). (2010).
11. Nakamura, E. Avaliação das concentrações de pesticidas organoclorados em águas superficiais pela otimização da técnica usaeme. 79 (2015).
12. Kudsk, P., Jørgensen, L. N. & Ørum, J. E. Pesticide Load—A new Danish pesticide risk indicator with multiple applications. *Land use policy* **70**, 384–393 (2018).
13. Samsidar, A., Siddiquee, S. & Shaarani, S. M. A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and foodstuffs. *Trends Food Sci. Technol.* **71**, 188–201 (2018).
14. Carneiro, F. F. (Org. ., Augusto, L. G. da S., Rigotto, R. M., Friedrich, K. & Búrigo, A. C. *Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Associação Brasileira de Saúde Coletiva - ABRASCO* (2015). doi:10.1016/B978-84-458-2066-7.00003-3
15. Carvalho, B. G. & Assis, L. H. De. Relatório: Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos no Mato Grosso do Sul. 1–18 (2012).
16. ANVISA. Monografias autorizadas - Anvisa. (2016).
17. Fumes, B. H. Avaliação do emprego da técnica MEPS na análise de agrotóxicos em caldo de cana-de-açúcar po GC-MS. (2015).
18. Presidency of the Republic of Brazil. Law No. 7,802, of July 11, 1989. *Off. J.*

- union 12/07/1989, p. 3, Sect. 1 (1989).*
19. Furlani, R. P. Z. & Tfouni, S. A. V. Resíduos de pesticidas sistêmicos em caldos de cana comercializados na cidade de Campinas, SP. 1–6 (2008).
 20. Luiz, J. & Júnior, R. Otimização e validação de método para determinação de pesticidas organoclorados em água de poços empregando MEFS-CG-DCE. (2006).
 21. Diaz, B. *Residuos de pesticidas organoclorados en leche de vaca*. Departamento de Cordoba. (2017).
 22. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. PORTARIA Nº 329, DE 02 DE SETEMBRO DE 1985. 1988 (1988).
 23. PAVANI, N. dias. Pesticidas: Uma revisão dos aspectos que envolvem esses compostos. 1–64 (2016).
 24. Kováčik, J. *et al.* Accumulation and toxicity of organochlorines in green microalgae. *J. Hazard. Mater.* **347**, 168–175 (2018).
 25. Duan, J., Cheng, Z., Bi, J. & Xu, Y. Residue behavior of organochlorine pesticides during the production process of yogurt and cheese. *Food Chem.* **245**, 119–124 (2018).
 26. BRASIL. DECRETO Nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. *Publ. no D.O.U em 08/01/2002.* 3220–3304 (2002).
 27. ANVISA. Programa de análise de resíduos de Agrotóxicos em alimentos (PARA). *Relatório de Atividades de 2011 e 2012* (2013). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
 28. Luiz, A. L., Maciel, E. V. S. & Lanças, F. M. Uma abordagem conceitual das técnicas miniaturizadas de preparo de amostra e suas aplicações na análise de resíduos e contaminantes em matrizes alimentares. *Sci. Chromatogr.* **7**, 157–182 (2015).
 29. Kokosa, J. M. Recent trends in using single-drop microextraction and related techniques in green analytical methods. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **71**, 194–204 (2015).
 30. Yohannes, A., Tolesa, T., Merdassa, Y. & Megersa, N. Analytical & Bioanalytical Techniques Single Drop Microextraction Analytical Technique for Simultaneous Separation and Trace Enrichment of Atrazine and its Major Degradation Products from Environmental Waters Followed by Liquid Chromatographic Determinati. **7**, (2016).
 31. Pano-Farias, N. S. *et al.* Direct immersion single drop micro-extraction method for multi-class pesticides analysis in mango using GC–MS. *Food Chem.* **237**, 30–38 (2017).
 32. Lanças, F. M. Avanços Recentes e Tendências Futuras das Técnicas de Separação : uma visão pessoal. *Sci. Chromatogr.* **0**, 17–44 (2008).
 33. dos Anjos, J. P. Desenvolvimento e Aplicação de Método Multirresíduo por SDME/GC-MS para a Determinação de 19 Pesticidas em Amostras de Água de Coco e Vinho Branco. (2014).
 34. Šrámková, I. H., Horstkotte, B., Fikarová, K., Sklenářová, H. & Solich, P.

- Direct-immersion single-drop microextraction and in-drop stirring microextraction for the determination of nanomolar concentrations of lead using automated Lab-In-Syringe technique. *Talanta* (2018).
35. Wang, X. *et al.* Fully automatic single-drop microextraction with one-setp extraction and derivatization and its application for rapid analysis of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in seawaters. *Talanta* **164**, 727–734 (2017).
 36. Sajid, M. & Płotka-Wasyłka, J. Combined extraction and microextraction techniques: Recent trends and future perspectives. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **103**, 74–86 (2018).
 37. Dos Anjos, J. P. & De Andrade, J. B. Determination of nineteen pesticides residues (organophosphates, organochlorine, pyrethroids, carbamate, thiocarbamate and strobilurin) in coconut water by SDME/GC-MS. *Microchem. J.* **112**, 119–126 (2014).
 38. Li, Y. *et al.* Purification and enrichment of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples by column clean-up coupled with continuous flow single drop microextraction. *J. Chromatogr. A* (2018).
 39. Carlos, E. A. Determinação simultânea de Trialometanos e Agrotóxicos em água empregando microextração em fase sólida e microextração em gota única por cromatografia gasosa. 1–49 (2012).
 40. Amvrazi, E. G. & Tsiropoulos, N. G. Application of single-drop microextraction coupled with gas chromatography for the determination of multiclass pesticides in vegetables with nitrogen phosphorus and electron capture detection. *J. Chromatogr. A* 2789–2797 (2009).
 41. Pinto, I. P. De & Pedroso, M. P. Microextração em gota única (SDME): fundamentos e aplicações. *Sci. Chromatogr.* **7**, 183–198 (2015).
 42. Xiao, Q., Yu, C., Xing, J. & Hu, B. Comparison of headspace and direct single-drop microextraction and headspace solid-phase microextraction for the measurement of volatile sulfur compounds in beer and beverage by gas chromatography with flame photometric detection. *J. Chromatogr. A* **1125**, 133–137 (2006).
 43. Viera-santana, S. & Santana-rodríguez, J. J. Técnicas analíticas avanzadas para la Extracción y preconcentración de contaminantes emergentes en muestras líquidas. **95**, 77–95 (2015).
 44. Soares, C. E. dos S. Desenvolvimento de métodos hifenados com microextração em gota única para determinação de resíduos de agrotóxicos em água e solo por cromatografia gasosa. (2015).
 45. Li, X. *et al.* Determination of patulin in apple juice by single-drop liquid-liquid-liquid microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chem.* (2018).
 46. Merib, J. & Carasek, E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. *Sci. Chromatogr.* **5**, 249–262 (2013).
 47. Spietelun, A., Marcinkowski, Ł., De La Guardia, M. & Namieśnik, J. Green

- aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. *Talanta* **119**, 34–45 (2014).
48. Martins, M. L. *et al.* Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **4**, 35–51 (2012).
 49. Hashemi, B. *et al.* Recent advances in liquid-phase microextraction techniques for the analysis of environmental pollutants. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **97**, 83–95 (2017).
 50. Botrel, B. M. C. *et al.* Residual determination of anesthetic menthol in fishes by SDME/GC–MS. *Food Chem.* **229**, 674–679 (2017).
 51. dos Anjos, J. P. & de Andrade, J. B. Simultaneous determination of pesticide multiresidues in white wine and rosé wine by SDME/GC-MS. *Microchem. J.* **120**, 69–76 (2015).
 52. Rajabi, S. K. & Nikserasht, A. Investigation of directly suspended droplet micro extraction method for extraction of trihalomethane and halomethane in water samples. *Egypt. J. Pet.* 2–6 (2017).
 53. Sanagi, M. M., Abbas, H. H., Ibrahim, W. A. W. & Aboul-Enien, H. Y. Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic droplet for the determination of triazine herbicides in water and sugarcane samples. *Food Chem.* (2012).
 54. Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos DOQ-CGCRE-008. **Revisão 07**, (2018).
 55. Brito, N. M., Junior, O. D. P. A., Polese, L. & RIBEIRO, M. L. Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão. *Pestic. R.Ecotoxicol. e Meio Ambient.* **13**, 129–146 (2003).
 56. Brito, N. M., Polese, L., Dos Santos, T. R. & Ribeiro, M. L. Avaliação Da Exatidão E Da Precisão De Métodos De Análise De Resíduos De Pesticidas Mediante Ensaios De Recuperação. *Rev. Ecotoxicologia e Meio Ambient.* **12**, 155–168 (2002).
 57. Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler, S. R. C. *Fundamentos de Química Analítica.* (2014).
 58. Lanças, F. M. *Fundamentos da Cromatografia Gasosa.* (2017).
 59. PENHA, G. J. Determinação dos limites de detecção e de quantificação para análise de elementos-traço em amostras ambientais por Espectrofotometria de Absorção Atômica. (2017).