

Anderson Luiz Oenning

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISES
TOXICOLÓGICAS FORENSES NA DETERMINAÇÃO DE
PRAGUICIDAS EM URINA HUMANA EMPREGANDO A TÉCNICA
DE EXTRAÇÃO EM PONTEIRAS DESCARTÁVEIS E GC-MS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Oenning, Anderson Luiz

Desenvolvimento de metodologia para análises toxicológicas forenses na determinação de praguicidas em urina humana empregando a técnica de extração em ponteiras descartáveis e GC-MS / Anderson Luiz Oenning ; orientador, Eduardo Carasek da Rocha, 2018.

83 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Química. 2. Preparo de amostras. 3. Extração em ponteiras descartáveis. 4. Praguicidas. 5. Toxicologia forense. I. Rocha, Eduardo Carasek da. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Anderson Luiz Oenning

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISES
TOXICOLÓGICAS FORENSES NA DETERMINAÇÃO DE
PRAGUICIDAS EM URINA HUMANA EMPREGANDO A TÉCNICA
DE EXTRAÇÃO EM PONTEIRAS DESCARTÁVEIS E GC-MS**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química Analítica e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química.

Florianópolis, 20 de fevereiro de 2018.

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química

Banca examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Luciano Vitali
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof^a. Dr^a. Alcíbia Helena de Azevedo Maia
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

“A experiência nunca falha, apenas as nossas opiniões falham, ao esperar da experiência aquilo que ela não é capaz de oferecer.”

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer à minha mãe pois ela é minha base de tudo. Obrigado mãe, te amo!

Ao meu professor orientador Eduardo Carasek, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho de mestrado, pela confiança, pela orientação e principalmente pela transmissão de conhecimentos. Muito obrigado!

Ao Josias Merib, pela troca de conhecimentos e ensinamentos durante todo o período do mestrado. Meu muito obrigado, de verdade!

Aos meus amigos e colegas do laboratório CroMaas pelo companheirismo, conselhos e conversas descontraídos no laboratório, bares e festas. Vocês são demais!

Aos meus amigos Ana Paula, Fran, Bruna Reis, Laís, Nathália, Alana, Bruna Auras, Suélen, William, Lucas Verli, João, Nelson, Dani, Caroline, Helena, Janaína, Jéssica e Renata obrigado pelo apoio e por tantos momentos felizes juntos.

À minha família que sempre me deu total apoio na minha jornada acadêmica e que sempre entendeu minha ausência nos momentos familiares.

Às amigadas que fiz durante meus estudos para os concursos públicos, especialmente a Leilane, Flávia, Felipe, Manuella, Gustavo, Amanda, Rebecca, Ana, Milena e Helena pela troca de conhecimentos e também por todos os momentos de sofrimento e angústia que passamos juntos durante os estudos e também esperando os resultados, que para a maioria de nós foram muito positivos. Obrigado a todos e que venha a tão sonhada nomeação dos futuros Peritos Criminais!

Aos meus amigos e outras pessoas que de alguma forma estiveram envolvidas nessa trajetória, meu muito obrigado!

À UFSC por conceder o espaço físico, materiais didáticos, ensino público e de qualidade para a conclusão dessa etapa.

Aos professores que compartilharam seus conhecimentos comigo durante o período do mestrado. Sem vocês, o país não avança! Obrigado!!!

E à Capes pela bolsa concedida.

RESUMO

Neste trabalho foi proposto a utilização inédita da técnica de extração em ponteiras descartáveis (DPX) para a determinação de praguicidas em urina humana em casos de envenenamento. Os praguicidas eleitos como analitos para serem estudados nesse trabalho foram o oxamil, propoxur, carbofurano, 3-hidroxicarbofurano, carbaril, metiocarbe, terbufós, metilparation, malation, clorpirifós e o endosulfano. A ponteira que foi adquirida comercialmente e utilizada para as extrações desses compostos possui capacidade de 5 mL e contém no seu interior 20 mg de material sorvente constituído de estireno-divinilbenzeno, um material polimérico com características apolares, ideal para a extração dos praguicidas escolhidos. As otimizações dos principais parâmetros que afetam a eficiência de extração dessa técnica de preparo de amostra foram realizadas de forma univariada e multivariada, sendo as condições ótimas de extração constituídas de 5 ciclos de extração de 30 segundos e 5 ciclos de dessorção de 15 segundos com 250 µL de acetato de etila. A eluição do extrato foi realizada em um frasco contendo cerca de 100 mg de sulfato de sódio anidro na qual 1 µL foi injetado manualmente em um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas (GC-MS) para que os analitos fossem separados e identificados. O método desenvolvido passou por uma etapa de validação na qual apresentou coeficientes de determinação superiores a 0,9911 para todos os analitos estudados, os valores de limite de detecção (LOD) foram de 0,76 e 1,52 µg L⁻¹ e de quantificação (LOQ) foram de 2,5 e 5,0 µg L⁻¹. Os ensaios de recuperação apresentaram valores na faixa de 63 a 118%, a precisão intra-dia variou de 0,7 a 15,3% e a de inter-dia de 4,9 a 13,1%. O tempo total necessário para o procedimento de extração é de cerca de 4 min para cada amostra e a corrida cromatográfica é de 24 min, o que caracteriza um método rápido e eficiente para análises toxicológicas forenses em urina humana na identificação das causas de envenenamentos por praguicidas.

Palavras-chave: praguicidas, agrotóxicos, toxicologia forense, urina, DPX, GC-MS.

ABSTRACT

In this work, the use of the technique of disposable pipette extraction (DPX) for the determination of pesticides in human urine in poisoning cases was proposed. The pesticides chosen as analytes in this work were oxamyl, propoxur, carbofuran, 3-hydroxycarbofuran, carbaryl, methiocarb, terbufos, methylparathion, malathion, chlorpyrifos and endosulfan. The tip that was commercially acquired and used for extractions of these compounds has a capacity of 5 mL and contains 20 mg of sorbent material composed of styrene-divinylbenzene, a polymeric material with non-polar characteristics, ideal for the extraction of pesticides. The optimization of the main parameters that affect the extraction efficiency of this sample preparation technique was performed in a univariate and multivariate way. The optimal extraction conditions were 5 extraction cycles of 30 seconds and 5 desorption cycles of 15 seconds with 250 μL of ethyl acetate. Elution of the extract was performed in a vial containing about 100 mg of anhydrous sodium sulfate and 1 μL was manually injected into a gas chromatographer coupled to mass spectrometry (GC-MS) where the analytes were separated and identified. The method developed was validated and showed determination coefficients higher than 0.9911 for all analytes, the limits of detection (LOD) were 0.76 and 1.52 $\mu\text{g L}^{-1}$ and the limits of quantification (LOQ) were 2.5 and 5.0 $\mu\text{g L}^{-1}$. The recoveries presented values ranging from 63 to 118%, intra-day precision ranged from 0.7 to 15.3% and inter-day from 4.9 to 13.1%. The total time required for the extraction procedure is about 4 min for each sample and the chromatographic run is 24 min, which characterizes a rapid method for forensic toxicological analyzes in human urine for identification of the causes of poisonings by pesticides.

Keywords: pesticides, forensic toxicology, urine, DPX, GC-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Agrotóxicos encontrados mais frequentemente nos casos de intoxicação humana.....	29
Figura 2 – Exemplos de cartuchos comerciais de SPE.....	37
Figura 3 – Esquema da ponteira utilizada na técnica de DPX.....	39
Figura 4 – Estrutura da fase extratora da ponteira do tipo DPX-RP composta do copolímero estireno-divinilbenzeno.....	41
Figura 5 – Etapas do procedimento de extração utilizando a técnica de DPX.....	43
Figura 6 – Procedimento do preparo da ponteira de DPX e acoplamento com a seringa.....	51
Figura 7 – Cromatograma da separação cromatográfica no GC-MS no modo SCAN com a injeção de 1 μL da mistura de padrões com concentração de 5 e 10 mg L^{-1} no modo <i>splitless</i>	60
Figura 8 – Gráfico da otimização do modo de ciclo de extração.....	61
Figura 9 – Superfície resposta da otimização do(s) solvente(s) de dessorção líquida.....	62
Figura 10 – Superfície resposta obtida para a otimização do número de ciclos e tempo de extração.....	64
Figura 11 – Superfície resposta obtida para a otimização do número de ciclos e tempo de dessorção.....	65
Figura 12 – Gráfico da otimização da etapa de limpeza e de condicionamento.....	66
Figura 13 – Diagrama do procedimento de preparo de amostra otimizado do método desenvolvido nesse trabalho.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos praguicidas baseado no seu grau de toxicidade segundo a OMS.	27
Tabela 2 – Número de casos, óbitos e porcentagem de letalidade por classe de agente tóxico reportados pelo CIATox/SC no período de 2008 a 2013.	28
Tabela 3 – Estrutura molecular, classe, pKa e toxicidade dos analitos estudados nesse trabalho.	32
Tabela 4 – Diferentes tipos de fase extratora comerciais com seus respectivos usos para a técnica de extração com DPX.	40
Tabela 5 – Trabalhos reportados da literatura e suas aplicações em análises utilizando a técnica de DPX no preparo de amostra.	47
Tabela 6 – Informações dos íons em relação às razões massa/carga dos analitos.	53
Tabela 7 – Planejamento da otimização do modo de ciclo de extração.	54
Tabela 8 – Planejamento de superfície triangular para a escolha do solvente ou mistura de solventes na etapa de dessorção líquida.	55
Tabela 9 – Planejamento <i>Doehlert</i> para a otimização do número de ciclos e tempo de extração.	56
Tabela 10 – Planejamento <i>Doehlert</i> para a otimização do número de ciclos e tempo de dessorção.	57
Tabela 11 – Tempos de retenção dos analitos obtidos na separação cromatográfica.	59
Tabela 12 – Equação da reta, faixa linear de trabalho, coeficiente de determinação, limite de detecção e de quantificação para os analitos...	69

Tabela 13 – Resultados obtidos através de ensaios de recuperação para a avaliação da exatidão e precisão do método desenvolvido.71

Tabela 14 – Comparação do método desenvolvido com outros reportados na literatura.....73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BA μ E – Microextração em Barra Adsorptiva, do inglês *Bar Adsorptive Microextraction*
- CIATox/SC – Centro de Informação e Assistência Toxicológica de Santa Catarina
- DL₅₀ – Dose Letal Média
- DPX – Extração em Ponteiros Descartáveis, do inglês *Disposable Pipette Extraction*
- FAO – Organização para Agricultura e Alimentação das Nações Unidas
- GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*
- GC/ECD/FPD – Cromatografia Gasosa com Detector de Captura de Elétrons e Detector Fotométrico de Chama, do inglês *Gas Chromatography/Electron Capture Detector/Flame Photometric Detector*
- GC-IT-MS/MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas com analisador do tipo *Ion Trap*, do inglês *Gas Chromatography – Ion Trap – Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*
- GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*
- GC-MS/MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography – Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*
- GC-MS- μ ECD – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas e ao Micro Detector de Captura de Elétrons, do inglês *Gas Chromatography – Mass Spectrometry – Micro Electron Capture Detector*
- IGP-SC – Instituto Geral de Perícias de Santa Catarina
- Kow – Coeficiente de partição óleo/água
- LC – Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*
- LC-ESI/MS/MS – Cromatografia Líquida com Ionização por *Eletro Spray* acoplado à Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography – Electrospray Ionization/Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*
- LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*
- LLE – Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*
- LOD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*
- LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

OMS – Organização Mundial da Saúde

r^2 – Coeficiente de Determinação

RP – Fase Reversa, do inglês *Reverse Phase*

RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

SBSE – Extração Sortiva em Barra de Agitação, do inglês *Stir Bar Sorptive Extraction*

SIM – Monitoramento de Íon Selecionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*

SPE – Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

SPME – Microextração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Microextraction*

UHPLC-QqQ-MS/MS – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas com Triplo Quadrupolo, do inglês *Ultra-High Performance Liquid Chromatography – Triple Quadrupolo - Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Toxicologia.....	23
2.1.1 Toxicologia Forense	24
2.2 Praguicidas	24
2.3 Analitos estudados	29
2.4 Preparo de amostra	35
2.4.1 Extração em ponteiras descartáveis.....	38
3 OBJETIVOS	49
3.1 Objetivo geral.....	49
3.2 Objetivos específicos.....	49
4 METODOLOGIA	50
4.1 Materiais e reagentes.....	50
4.2 Amostras de urina.....	50
4.3 Preparo da ponteira descartável	50
4.4 Instrumentação e condições cromatográficas	51
4.5 Otimizações da técnica de extração em ponteiras descartáveis	53
4.5.1 Condições fixadas inicialmente	53
4.5.2 Otimização do modo de ciclo de extração.....	54
4.5.3 Otimização do(s) solvente(s) da dessorção líquida.....	54
4.5.4 Otimização do número de ciclos e tempo de extração	55

4.5.5	<i>Otimização do número de ciclos e tempo de dessorção</i>	56
4.5.6	<i>Otimização da etapa de limpeza e de condicionamento</i>	57
4.6	Validação da metodologia desenvolvida	57
4.7	Programas utilizados na análise dos dados	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	Otimização da separação cromatográfica	59
5.2	Otimizações da técnica de extração em ponteiros descartáveis	60
5.2.1	<i>Otimização do modo de ciclo de extração</i>	60
5.2.2	<i>Otimização do(s) solvente(s) da dessorção</i>	61
5.2.3	<i>Otimização do número de ciclos e tempo de extração</i>	63
5.2.4	<i>Otimização do número de ciclos e tempo de dessorção</i>	64
5.2.5	<i>Otimização da etapa de limpeza e de condicionamento</i>	66
5.2.6	<i>Estudo da adição de sal no frasco contendo o extrato</i>	67
5.3	Procedimento de preparo de amostra otimizado	67
5.4	Validação da metodologia desenvolvida	68
5.5	Comparação do método proposto com métodos descritos na literatura	72
7	PERSPECTIVAS	75
	REFERÊNCIAS	76
	ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS NO MESTRADO	83

1 INTRODUÇÃO

Desde que produtos destinados ao controle de pragas se tornaram comercialmente disponíveis em mercados e farmácias, eles têm sido utilizados de maneira irregular em todas as regiões do país e do mundo, o que aumentou os casos de intoxicação intencionais ou não por esses compostos. Casos de envenenamento reportados por diversos países mostram que há cerca de 250 mil a 370 mil mortes associadas a esse tipo de intoxicação a cada ano (KIR et al., 2013). A Organização Mundial de Saúde (OMS) relata que casos de morte por envenenamento devido ao contato com praguicidas é um dos métodos mais comuns de suicídio no mundo todo, sendo assim considerado um problema de saúde pública (WHO, 2018).

Dentre os compostos pertencentes à classe dos praguicidas, as substâncias presentes no grupo dos inseticidas são as mais frequentemente encontradas nas análises toxicológicas de material biológico como urina, sangue e conteúdo gástrico provenientes da autópsia de cadáveres que apresentam morte suspeita ou de maneira não natural, sendo pertinente uma análise toxicológica para consolidar as causas da morte desse indivíduo (YAYCI et al., 2004; LEVINE, 2005). A descoberta das causas dessas mortes é de extrema importância para a justiça, sendo assim, métodos de determinação de praguicidas em fluídos biológicos têm sido estudados ao longo dos anos (PARK et al., 2009).

Para a análise de matrizes biológicas é necessária uma etapa chamada de preparo de amostra que tem como objetivo separar o analito da matriz e também fazer a pré-concentração deles para serem posteriormente analisados pela técnica analítica mais adequada (QUEIROZ et al., 2001). Dentre as técnicas de preparo de amostra, a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida têm recebido destaque, principalmente aquelas derivadas dessas duas, que são técnicas miniaturizadas e chamadas de técnicas de microextração (JAIN et al., 2016).

Uma das técnicas que tem sido bastante empregada na análise de praguicidas é a extração em ponteiros descartáveis (DPX) que foi desenvolvida por William E. Brewer da Universidade da Carolina do Sul (BREWER, 2014). Essa técnica utiliza uma ponteira contendo um tipo de material sorvente no seu interior que é capaz de interagir com o analito, fazendo com que ele seja extraído da matriz e pré-concentrado para posterior análise em um instrumento analítico adequado (PINTO et al., 2015).

Desta forma, o desenvolvimento de um método de preparo de amostra rápido e eficiente para a extração de um vasto número de compostos pertencentes à classe dos inseticidas requisitando um baixo volume de amostra de urina humana torna-se indispensável no esclarecimento das causas da morte em casos de envenenamento por praguicidas no âmbito forense, sendo este o objetivo principal desse trabalho.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Toxicologia

A Toxicologia é uma ciência multidisciplinar que estuda os efeitos adversos provenientes da interação de substâncias químicas com o organismo vivo (LEVINE, 2005). A história da Toxicologia é acompanhada pela história da nossa civilização, pois desde os primórdios o homem já tinha conhecimento sobre os efeitos tóxicos do veneno de um vasto número de plantas e de alguns animais presentes naquela época, na qual o veneno dessas espécies era geralmente utilizado na caça como uma arma contra o inimigo que era capaz de acelerar a morte através da paralisia do músculo cardíaco e da musculatura esquelética (OGA, 2014).

O primeiro registro que se tem na história sobre substâncias tóxicas é datado de 1500 a.C. chamado de Papiro de Ebers, na qual lista cerca de 800 substâncias ativas, em que incluía metais como chumbo e cobre, venenos de animais e um vasto número de vegetais tóxicos. Ao longo dos anos essa lista foi crescendo com a contribuição da identificação de novos agentes tóxicos e terapêuticos por diferentes pesquisadores, onde a primeira classificação dessas substâncias em veneno de animais, vegetais e minerais foi realizada por Dioscórides (40-90 d.C.) (OGA, 2014).

A Toxicologia evoluiu pouco nos séculos XVII e XVIII com os métodos de estudos ainda muito empíricos, mas um personagem chamado de Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim-Paracelsus (1493-1541) merece destaque graças aos seus estudos revolucionários na época que envolviam as áreas de toxicologia, farmacologia e terapêutica. Philippus ficou muito conhecido com o seu postulado: “todas as substâncias são venenos, a dose correta é que diferencia o veneno do remédio” (OGA, 2014).

A partir dessa época, muito progresso foi feito na área da Toxicologia, desde estudos de venenos de serpentes, estudos dos efeitos provenientes da exposição em minas de mineração, introdução de conceitos de toxicidade em órgãos-alvo e a descrição de mecanismos de ação de vários agentes tóxicos e de fármacos. Sendo o auge desse progresso a introdução de técnicas analíticas para a identificação e quantificação desses agentes tóxicos em tecidos na tentativa de comprovar as causas dos envenenamentos, surgindo assim a Toxicologia Forense (PASSAGLI, 2009; OGA, 2014).

2.1.1 Toxicologia Forense

A Toxicologia Forense é uma das áreas da Toxicologia com finalidade legal em favor da justiça, sendo sua maior aplicação a identificação de qualquer substância química que possa causar danos ou até mesmo a morte de um ser humano (PASSAGLI, 2009; KLAASSEN e WATKINS, 2012).

Essa ciência é conhecida por ser geralmente aplicada para identificar substâncias como álcool e/ou drogas em motoristas e testes em urina humana para revelar abuso de algum tipo de droga. Mas as análises realizadas pela Toxicologia Forense são muito mais abrangentes, uma vez que visa a identificação de qualquer tipo de substância química relacionada à investigação das causas que levaram algum indivíduo ao óbito (LEVINE, 2005).

Para o melhor entendimento sobre o papel das substâncias químicas na intoxicação de uma pessoa, a experiência prática do toxicologista forense aliado ao uso de técnicas analíticas modernas e análises sistemáticas se tornam extremamente importantes. O agente tóxico pode estar presente na forma livre na matriz ou estar ligado a proteínas e a outros possíveis constituintes celulares, sendo assim, é necessário um prévio tratamento da amostra com o objetivo de isolar a substância da matriz antes de ser analisada (KLAASSEN e WATKINS, 2012).

Geralmente qualquer morte suspeita e/ou não natural é sujeita a passar por uma investigação forense como por exemplo nos casos de mortes que envolvem trauma ou violência, mortes que são potencialmente suspeitas de suicídio ou resultados de atividades criminais. A análise inicia-se no momento da autópsia do corpo com a coleta de diversas amostras biológicas para serem posteriormente analisadas por um toxicologista forense tais como sangue, urina, humor vítreo, fígado e conteúdo gástrico. As principais classes de substâncias de interesse forense são as drogas de abuso, medicamentos e outras substâncias como os praguicidas que geralmente são encontradas em casos de envenenamento (LEVINE, 2005).

2.2 Praguicidas

Os praguicidas, segundo a Organização para Agricultura e Alimentação das Nações Unidas (FAO), são substâncias ou misturas de substâncias introduzidas deliberadamente no ambiente visando a prevenção, destruição, repulsão ou amenização de pragas. Esse termo

também inclui as substâncias químicas destinadas a regularização do crescimento de plantas, desfolhamento, dessecamento, aos agentes para reduzir a densidade ou evitar a queda prematura dos frutos e também as substâncias que são aplicadas sobre as culturas antes e depois da colheita a fim de preservar o produto obtido no transporte e na armazenagem (OGA, 2014).

Na legislação brasileira (Lei nº 7.802/89), uma definição semelhante à da FAO é para agrotóxicos, que substitui o termo defensivo agrícola, com a intenção de denominar os venenos agrícolas e colocar em evidência a toxicidade que esses produtos apresentam tanto para o meio ambiente quanto para os seres humanos. É importante ressaltar que o termo “pesticidas” (tradução da palavra *pesticides*) é usada erroneamente na língua portuguesa como sinônimo da palavra praguicidas, já que peste não significa praga na nossa língua, ou seja, não se aplica nesse contexto (OGA, 2014).

Os praguicidas são classificados em diferentes classes que se baseiam nos padrões de uso e no tipo de praga que se deseja combater, sendo as principais: inseticidas (insetos), herbicidas (erva daninha), fungicidas (fungos e bolores), rodenticidas (roedores), acaricidas (ácaros), moluscicidas (caracóis e outros moluscos), larvicidas (larvas) e pediculicidas (piolho). Além dessas classificações, existe outra classificação mais ampla na qual inclui reguladores de crescimento de plantas, repelentes e atrativos (ferormônios) (KLAASSEN e WATKINS, 2012).

A exposição dos praguicidas pode ocorrer de diferentes maneiras sendo elas por via oral, dérmica ou por inalação. O contato por via oral pode acontecer através da ingestão de altas doses, o que leva a um estado de grave intoxicação com uma alta possibilidade da ocorrência de óbito, esse tipo de contato é geralmente advindo da ingestão intencional com o objetivo de causar suicídio ou ingestão acidental devido ao incorreto armazenamento desses compostos em embalagens inadequadas. Entretanto, pequenas doses desses compostos são ingeridas pela população mundial diariamente advindas do consumo de alimentos ou de água, ambos contendo resíduos desses contaminantes (KLAASSEN e WATKINS, 2012).

Os indivíduos que possuem maior risco de contato com os praguicidas são os trabalhadores envolvidos na produção, transporte, mistura e aplicação desses compostos, bem como, os trabalhadores que trabalham na colheita de lavouras que são pulverizadas com esses produtos. Nesses casos, acontece o contato por via dérmica, seja ele na

aplicação e manuseio ou por derramamento acidental desses compostos. O contato dérmico ocorre principalmente em áreas do corpo não protegidas com vestes ou equipamentos de proteção, como por exemplo nas mãos e na face ou por inalação (KLAASSEN e WATKINS, 2012).

Um dos efeitos negativos do uso dos praguicidas é que nem sempre eles são seletivos para as espécies-alvo, sendo assim, efeitos adversos podem ser observados em outros organismos não alvo e até mesmo em seres humanos. Devido a estes efeitos adversos causados na população, como por exemplo a intoxicação, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que os praguicidas sejam classificados com base no seu grau de toxicidade que é estabelecida nos resultados de testes de toxicidade oral e dérmica em ratos (KLAASSEN e WATKINS, 2012). A classificação dos praguicidas segundo o grau de toxicidade pela OMS está mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação dos praguicidas baseado no seu grau de toxicidade segundo a OMS.

Classe		DL ₅₀ em ratos (mg/kg peso corporal)			
		Oral		Dérmica	
		Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Ia	Extremamente tóxico	5 ou menos	20 ou menos	10 ou menos	40 ou menos
Ib	Altamente tóxico	5 – 50	20 – 200	10 – 100	40 – 400
II	Moderadamente tóxico	50 – 500	200 – 2000	100 – 1000	400 – 4000
III	Levemente tóxico	Acima de 500	Acima de 2000	Acima de 1000	Acima de 4000
IV+	Pouco provável que apresente toxicidade em condições normais	Acima de 2000	Acima de 3000	Acima de 4000	Acima de 6000

Fonte: Adaptado de KLAASSEN e WATKINS (2012).

No estado de Santa Catarina, através das informações publicadas pelo Centro de Informação e Assistência Toxicológica de Santa Catarina (CIATox/SC), ocorreram 2.780 casos de intoxicação por agrotóxicos entre 2008 e 2013, com 102 casos fatais, sendo a morte causada pela intoxicação por agrotóxicos a que causou o maior número de mortes em relação aos outros tipos de intoxicação envolvendo outros agentes, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Número de casos, óbitos e porcentagem de letalidade por classe de agente tóxico reportados pelo CIATox/SC no período de 2008 a 2013.

Classe de agente	Nº de casos	Nº de óbitos	Letalidade (%)
Medicamentos	15.803	91	0,58
Animais peçonhentos	15.232	12	0,08
Diagnóstico diferencial	6.095	10	0,16
Animais não peçonhentos	4.068	-	-
Produtos químicos domissanitários	3.808	6	0,16
Agrotóxicos	2.780	102	3,67
Produtos químicos industriais	2.595	5	0,19
Drogas de abuso	1.965	53	2,70
Raticidas	1.596	1	0,06
Agrotóxicos uso doméstico	1.234	2	0,16
Plantas	794	1	0,13
Cosméticos	464	-	-
Produtos veterinário	416	5	1,20
Metais	185	-	-
Alimentos	108	-	-
Outros	138	2	1,45
Total	57.281	290	0,51

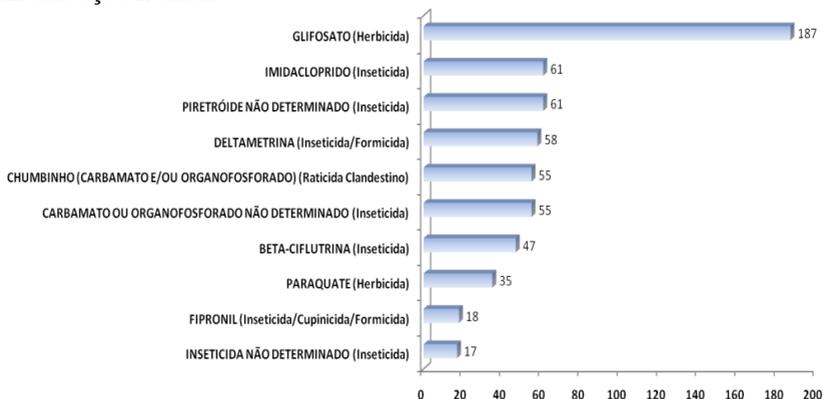
Fonte: Adaptado de CIATox/SC (2018).

No último relatório publicado em 2015 pelo CIATox/SC, os agrotóxicos estiveram envolvidos em 668 casos de intoxicação, sendo estes casos ocorridos de maneira isolada ou em associação com outras classes de agentes, abrangendo cerca de 794 substâncias diferentes. A circunstância mais frequente envolvendo a intoxicação por agrotóxicos foi a tentativa de suicídio (42,9%), seguida pela exposição acidental (30,7%) e ocupacional (23,2%).

A Figura 1 mostra os agrotóxicos que são frequentemente mais encontrados nos casos de intoxicação por essa classe de agente. Dentre os 594 casos reportados nessa figura, 372 envolveram intoxicação pelo grupo dos inseticidas, o que corresponde a cerca de 63% dos casos e

demonstra que esse grupo de substâncias geralmente é o mais encontrado em casos de intoxicação (CIATox/SC, 2016).

Figura 1 – Agrotóxicos encontrados mais frequentemente nos casos de intoxicação humana.



Fonte: CIATox/SC (2016).

Os dados acima mostram que os casos de intoxicação intencional ou não intencional por praguicidas são um problema público de saúde no estado de Santa Catarina. Mas estudos mostram que esse problema assola também o mundo inteiro, em que todos os anos morrem cerca de 250 a 370 mil pessoas devido a ingestão desse tipo de substância química. A OMS reconhece os casos de envenenamento por praguicidas um dos principais meios de suicídio no mundo todo, sendo os inseticidas o grupo de compostos que causam a maior parte das mortes (WHO, 2018).

2.3 Analitos estudados

Nesse trabalho, os analitos estudados são todos pertencentes à classe dos inseticidas, já que são os maiores causadores das mortes por envenenamento. Essa classe pode ser dividida em quatro principais grupos: carbamatos, organofosforados, organoclorados e piretróides (KLAASSEN e WATKINS, 2012; OGA, 2014), onde nesse trabalho serão estudados apenas analitos pertencentes às três primeiras classes.

Os compostos pertencentes ao grupo dos carbamatos são formados por derivados do ácido N-metil-carbâmico e dos ácidos tiocarbamatos e ditiocarbamatos, cada derivado apresenta toxicidade

diferente e conseqüentemente usos distintos. Os carbamatos apresentam baixa pressão de vapor e baixa solubilidade em água, sendo moderadamente solúveis em benzeno e tolueno e altamente solúveis em metanol e acetona (LARINI, 1999; OGA, 2014).

Já os compostos pertencem ao grupo dos organofosforados são ésteres amido ou tiol-derivados dos ácidos fosfórico, fosfônico, fosforotióico e fosfonotióico. Possuem alta suscetibilidade de sofrer hidrólise e apresentam alta lipossolubilidade, ou seja, alto coeficiente de partição óleo/água (Kow) (LARINI, 1999; OGA, 2014).

Os carbamatos e os organofosforados são geralmente absorvidos pela pele, vias aéreas e pelo trato gastrointestinal e sua absorção pode ser muitas vezes acelerada pelos solventes que compõem a formulação do praguicida. Após absorvido, esses compostos são distribuídos para todos os tecidos onde sofrem a biotransformação, processo este que ocorre principalmente no fígado com a função de transformar os compostos em espécies que são mais facilmente excretadas pelo organismo. A eliminação destes compostos ocorre principalmente pela urina e fezes, na qual uma pequena parcela é eliminada sem modificação. O fígado é o principal órgão responsável pela realização de reações químicas de oxidação, redução, clivagem hidrolítica e conjugação na biotransformação dos inseticidas organofosforados para a excreção na urina. Já para os inseticidas do grupo dos carbamatos as reações de maior importância compreendem a hidrólise, hidroxilação do grupamento N-metil e hidroxilação do anel aromático. (LARINI, 1999; OGA, 2014).

Os compostos dos grupos dos carbamatos e dos organofosforados são inseticidas anticolinesterásicos, ou seja, seu mecanismo de ação tóxica no organismo deve-se à inibição enzimática da acetilcolinesterase neuronal, que é uma enzima com a função de degradar o neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético na sinapse nervosa fazendo com que o neurônio retorne ao estado de relaxamento após a transmissão do impulso nervoso. Com a inibição dessa enzima pelo contato com esses compostos, ocorre o acúmulo de acetilcolina nas terminações nervosas, o que leva o organismo a uma síndrome colinérgica aguda surgindo alguns sinais e sintomas muscarínicos, nicotínicos e no sistema nervoso central, na qual essas manifestações são totalmente dependentes da dose, da via de exposição, taxa de absorção e da toxicidade envolvidas na ocorrência. Os principais sintomas em casos de intoxicação por esses compostos são a alternância de miose (diminuição da pupila) e midríase (dilatação da pupila), lacrimejamento, visão turva, salivção excessiva, bradicardia, hipotensão, taquipneia, insuficiência

respiratória, paralisia respiratória e morte (OGA, 2014; MOREAU et al., 2014)

Já os compostos pertencentes ao grupo dos organoclorados são cíclicos e com baixa volatilidade, sendo estimulantes do sistema nervoso central. São compostos que apresentam bioacumulação, biomagnificação e persistência por várias décadas o que traz sérios danos ao meio ambiente e aos seres vivos. São absorvidos pela pele e pelo trato digestivo e respiratório, apresentando alta lipossolubilidade o que facilita a sua distribuição e deposição no tecido adiposo. A eliminação é feita principalmente pela via biliar, onde a maioria dos compostos geram produtos de biotransformação na urina principalmente através de reações de oxidação (LARINI, 1999; OGA, 2014).

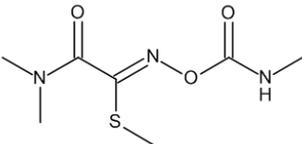
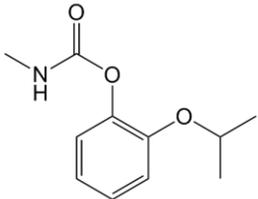
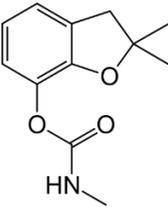
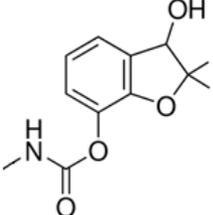
A atuação dos inseticidas organoclorados no organismo se dá principalmente na alteração das propriedades eletrofisiológicas presentes na membrana dos neurônios e das enzimas relacionadas como a Na^+ -ATPase e K^+ -ATPase, modificando a cinética do fluxo dos íons sódio e potássio, o que resulta na alteração da transmissão de impulso nervoso, levando a disparos repetitivos do estímulo nervoso. As manifestações clínicas causadas pela intoxicação com organoclorados também são dependentes do organismo envolvido, da via de exposição e do veículo utilizado como diluente, sendo os principais sintomas as náuseas, vômitos, desconforto abdominal, diarreia, cefaleia, tremores, convulsões e a morte (PASSAGLI, 2009; OGA, 2014).

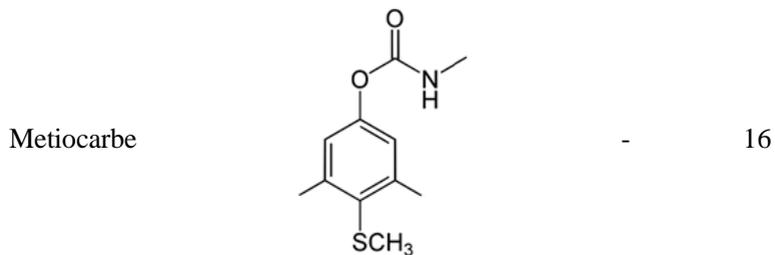
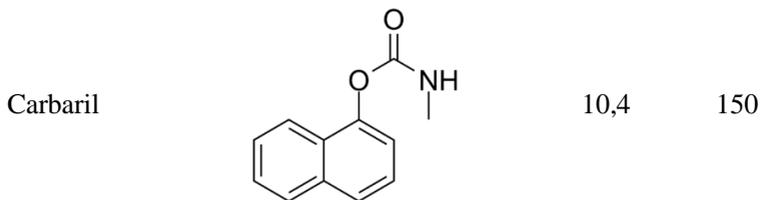
Em casos de intoxicações graves, principalmente naqueles que levam o indivíduo a óbito, os praguicidas podem ser encontrados na urina na forma não metabolizada, pois o intervalo entre a ingestão e a morte é insuficiente para ocorrer a biotransformação do agente tóxico (STACEY e WINTER, 2004; VALENTE, 2012). Devido a esse fato, na literatura são reportados diferentes métodos de análises de praguicidas na sua forma não metabolizada em urina humana (JIA et al., 2008; CAZORLA-REYES et al., 2011; LÓPEZ et al., 2011).

A escolha dos analitos a serem estudados nesse trabalho deu-se a partir de informações cedidas pelo Instituto Geral de Perícias de Santa Catarina (IGP-SC), na qual o órgão relatou os principais praguicidas que são encontrados em análises toxicológicas forenses em casos de envenenamento. Dentre os analitos escolhidos, os compostos oxamil, propoxur, carbofurano, 3-hidroxicarbofurano, carbaril e metiocarbe pertencem ao grupo dos carbamatos; o terbufós, metilparation, malation e o clorpirifós são organofosforados e o endossulfano é um organoclorado.

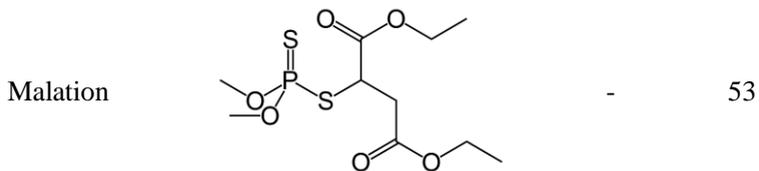
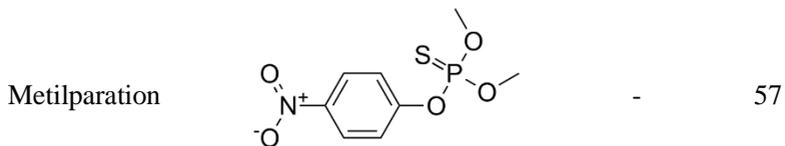
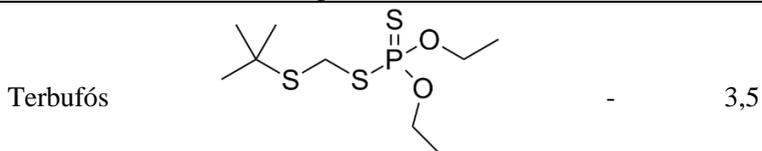
As estruturas moleculares, a classe, o valor de pKa e o grau de toxicidade destes compostos estão apresentados na Tabela 3.

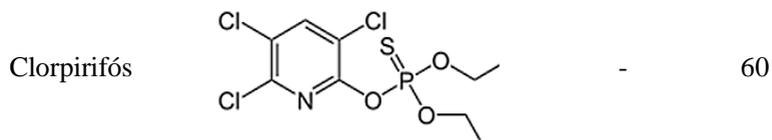
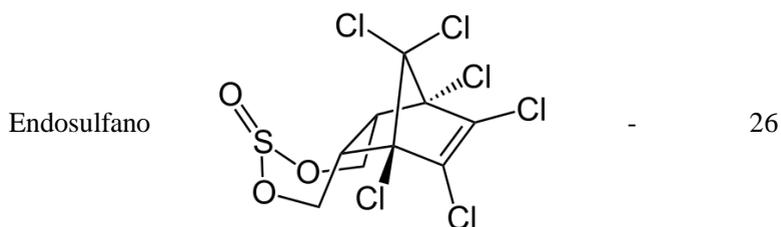
Tabela 3 – Estrutura molecular, classe, pKa e toxicidade dos analitos estudados nesse trabalho.

Analito	Estrutura molecular	pKa ^a	Toxicidade - LD ₅₀ (mg/kg) ^b
Carbamatos			
Oxamil		2,11	30
Propoxur		-	51,2
Carbofurano		-	10,2
3-hidroxicarbofurano		3,6	7



Organofosforados



**Organoclorado**

^a PPDB, 2018.

^b LUZARDO et al., 2015; TOXNET, 2018.

Fonte: Autoria própria (2018).

2.4 Preparo de amostra

No universo da química analítica lida-se diariamente com a determinação de analitos presentes muitas vezes em baixas concentrações em matrizes complexas e cada etapa do processo analítico é extremamente relevante. Desde a coleta da amostra até o momento de processamento dos dados obtidos se está sujeito à introdução de pequenos erros que podem comprometer a qualidade final do resultado da análise (FUMES et al., 2015).

Devido a necessidade de assegurar a qualidade, a reprodutibilidade e a integridade dos dados, especialmente em algumas áreas como análises farmacêuticas, alimentares e forenses, algumas agências regulamentadoras requerem alguns procedimentos que incluem a validação do método e o tratamento estatístico dos dados a fim de se obter resultados confiáveis (FUMES et al., 2015).

Apesar dos avanços na instrumentação analítica nas últimas décadas, especialmente na área da cromatografia e da espectrometria de massas, ainda não é possível obter resultados desejados de análises de amostras complexas com a injeção direta da amostra no instrumento analítico sem uma etapa de pré-tratamento chamada de preparo de amostra (FUMES et al., 2015).

A etapa de preparo de amostra possui importância fundamental para o sucesso de qualquer método analítico, sendo essa etapa muitas vezes dependente tanto das características da matriz e de seus constituintes quanto dos analitos, o que requer a realização de otimizações apropriadas dos diferentes parâmetros de influência, principalmente no desenvolvimento de novos métodos analíticos. Há alguns anos atrás, essa etapa não recebia a devida atenção, mas com os avanços da instrumentação analítica, esforços têm sido feitos na intenção de melhorar e desenvolver novas e diferentes técnicas de preparo de amostra (ASENSIO-RAMOS et al., 2011).

Na etapa de preparo de amostra, visam-se algumas características importantes, tais como a rapidez, a simplicidade, o aumento da seletividade e da especificidade, o baixo custo, o potencial de automação ou a utilização de métodos *on-line*. Outra característica importante é o uso de pequenas quantidades ou nenhuma de solventes orgânicos visando assim uma menor agressão ao meio ambiente e a redução do desperdício gerado nos laboratórios de análises (SAITO et al., 2003; SMITH et al., 2003).

A etapa de preparo de amostra tem como principal objetivo separar os analitos da matriz da amostra e/ou concentrá-los para análises em nível traço. Tendo em vista os problemas que podem surgir da introdução direta desse tipo de amostra no instrumento analítico, analistas comumente utilizam essa etapa para evitar possíveis danos ao aparelho (ROCHA et al., 2013).

Ao passar dos anos foram desenvolvidas técnicas de preparo de amostras que hoje em dia são consideradas técnicas tradicionais, tais como a extração sólido-líquido, conhecido como *Soxhlet*, a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) e a extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) (BOYACI et al., 2015).

As técnicas *Soxhlet* e LLE são muito lentas e trabalhosas, requisitando grandes volumes de solventes orgânicos nas extrações e subsequentemente necessidade de um procedimento de evaporação para se obter uma concentração do analito significativa para análises em nível traço. Além disso, a evaporação dos solventes no ambiente do laboratório pode causar prejuízos à saúde do analista (BIDARI et al., 2011). Já a SPE traz algumas vantagens em relação às outras duas técnicas pois menores volumes de solventes orgânicos são utilizados nas extrações que ocorrem no interior de cartuchos comerciais utilizados apenas uma única vez, mas traz como desvantagem a grande quantidade de resíduos gerada (RODRIGUES et al., 2010). A Figura 2 mostra exemplos de cartuchos comerciais de SPE.

Figura 2 – Exemplos de cartuchos comerciais de SPE.



Fonte: SIGMA-ALDRICH (2018).

Os cartuchos convencionais de SPE são geralmente feitos com uma seringa de polipropileno com capacidade de 3 ou 5 mL contendo um material sorvente no seu interior com massa de 500 mg. Entretanto, com o passar dos anos, novos formatos e tamanhos foram desenvolvidos, utilizando menores massas de fase extratora e menores volumes, como por exemplo 100 mg de material contidos em uma seringa de 1 mL de capacidade. Alguns fabricantes também introduziram no mercado cartuchos ainda menores, contendo 10, 25 e 50 mg de sorvente (MAJORS, 2001).

Com o aumento da sensibilidade dos instrumentos analíticos ocorreu um avanço nas técnicas de preparo de amostra, em que se permite o uso de menores quantidades de amostra e conseqüentemente a necessidade de uso de menores massas de fase extratoras, na qual o volume de solvente e o tempo de análise também são reduzidos (FUMES et al., 2015).

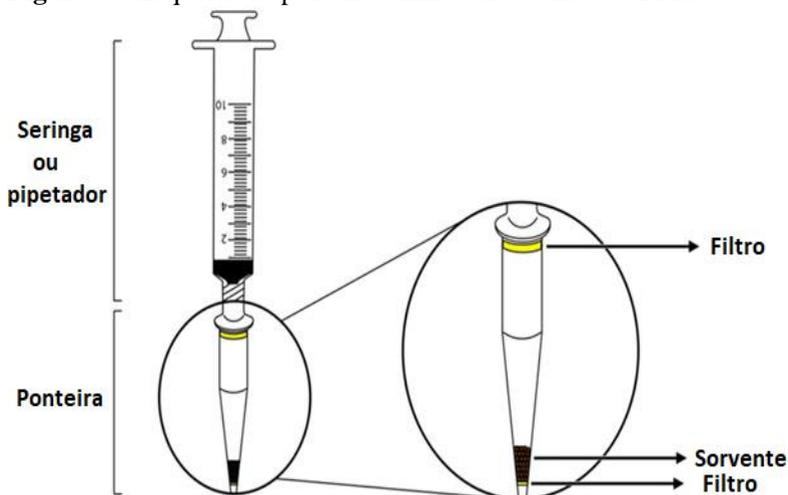
Algumas técnicas que trazem esses avanços são as técnicas miniaturizadas de preparo de amostra, tais como a Microextração em Fase Sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Microextraction*), a Extração Sortiva em Barra de Agitação (SBSE, do inglês *Stir Bar Sorptive Extraction*), a Microextração em Barra Adsorptiva (BA μ E, do inglês *Bar Adsorptive Microextraction*) e a Extração em Ponteiras Descartáveis (DPX, do inglês *Disposable Pipette Extraction*) (ARTHUR et al., 1990; BALTUSSEN et al., 1999; NOGUEIRA, 2013; BREWER et al., 2014).

2.4.1 Extração em ponteiras descartáveis

Uma das técnicas baseada na extração em fase sólida e que foi empregada nesse trabalho é a DPX que foi desenvolvida pelo Dr. William E. Brewer, da Universidade da Carolina do Sul, no ano de 2003 através da patente de número US6566145 B2 (BREWER, 2014). Essa técnica traz uma modificação da convencional técnica de SPE com o principal objetivo de diminuir além da quantidade de material sorvente empregado como fase extratora, o tempo de extração e também a quantidade de solventes utilizados nas extrações (PINTO et al., 2015; BORDIN et al., 2016).

A modificação inédita trazida pela técnica de DPX é a utilização de uma ponteira convencional de laboratório com capacidade de 1 ou 5 mL, na qual no seu interior está contido uma certa quantidade de material sorvente acondicionado livremente entre dois filtros, sendo um deles colocado na extremidade inferior e outro na extremidade superior da ponteira, como mostrado na Figura 3. A função do primeiro filtro, que pode ser uma tampa de vidro sinterizado, de lã de vidro, de polímero poroso ou de metal, é proporcionar uma espécie de barreira permeável que permite a passagem livre dos fluídos em qualquer direção, seja na aspiração ou na dispersão, ao mesmo tempo em que retém a fase extratora contida no interior da ponteira. Já o segundo filtro, localizado na extremidade superior, tem a função de impedir a passagem de qualquer material sólido ou líquido para o interior do pipetador ou da seringa, o que assegura a não contaminação dos mesmos e consequentemente a retenção do material sorvente no interior da ponteira (PINTO et al., 2015).

Figura 3 – Esquema da ponteira utilizada na técnica de DPX.



Fonte: Adaptado de BORDIN et al. (2016).

A primeira ponteira de DPX que foi comercialmente disponível foi baseada na cromatografia clássica com a utilização de partículas C18 incorporadas com polímeros como fase extratora (CHAVES et al., 2015). A partir daí, como ocorreu com os cartuchos de SPE tradicionais, novos materiais sorventes foram introduzidos no mercado com diferentes mecanismos de extração específicos para cada grupo de analitos, conforme mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Diferentes tipos de fase extratora comerciais com seus respectivos usos para a técnica de extração com DPX.

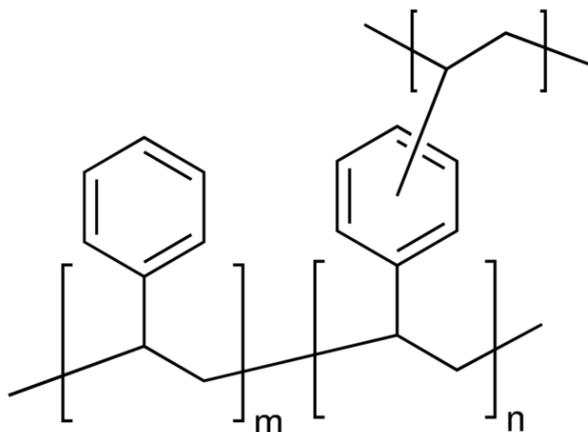
Tipo de ponteira	Composição da fase extratora	Uso
DPX-RP	Estireno-divinilbenzeno	Extração de compostos apolares e pouco polares. Ex: praguicidas
DPX-CX	Grupos ácido sulfônico	Extração de compostos básicos. Ex: drogas de caráter básico
DPX-WAX	Grupo poliamino	Extração de compostos ácidos. Ex: drogas e metabólitos
DPX-WCX	Grupos policarboxilato	Extração de compostos básicos. Ex: especialmente amino glicosídeos
DPX-Si	Sílica gel	Limpeza (<i>cleanup</i>) de amostras ambientais
DPX-C18	C18 (20% de sílica gel)	Remoção de interferentes presentes na matriz
DPX-SC	Vazio ou com areia (lavada com ácido)	Coleta de amostras sólidas
DPX-Blank	Vazio	Desenvolvimento de métodos com novas fases extratoras

Fonte: Adaptado de PINTO et al. (2015).

Nesse trabalho foi utilizada a ponteira do tipo DPX-RP, na qual a fase extratora contida no interior da ponteira é constituída de estireno-divinilbenzeno, um copolímero com características hidrofóbicas

semelhante à fase estacionária utilizada em cromatografia líquida no modo de fase reversa, por isso a sigla RP, do inglês *reverse phase* (GUAN et al., 2010). Na Figura 4 está ilustrado a estrutura do copolímero estireno-divinilbenzeno.

Figura 4 – Estrutura da fase extratora da ponteira do tipo DPX-RP composta do copolímero estireno-divinilbenzeno.



Fonte: SIGMA-ALDRICH (2018).

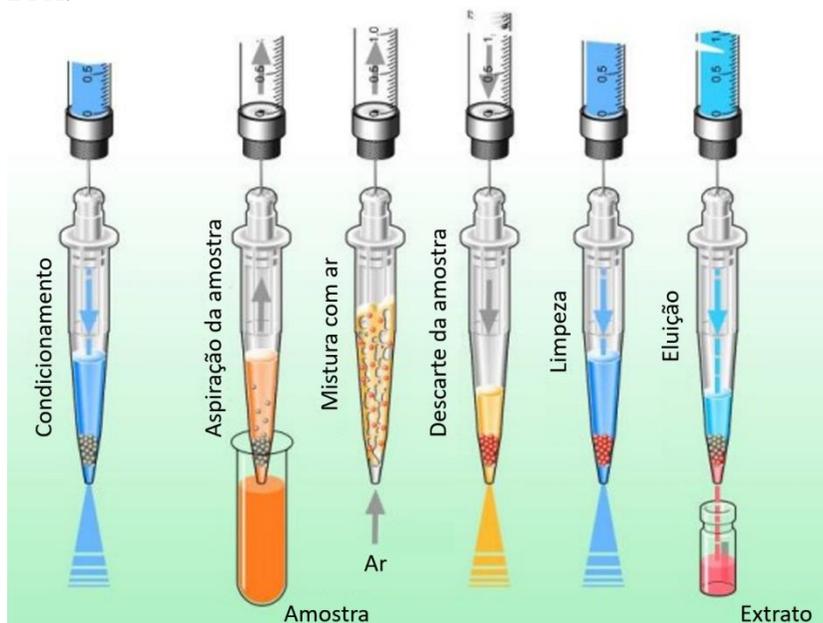
O mecanismo de retenção dos analitos pela fase extratora contendo o estireno-divinilbenzeno da ponteira do tipo DPX-RP é baseado em interações hidrofóbicas e interações π - π com o anel aromático presente nessa estrutura. A combinação desses dois mecanismos fornece um elevado potencial para uma extração seletiva da maioria dos compostos utilizados como praguicidas. Devido à natureza hidrofóbica, o sorvente interage com os analitos através de forças de Van der Waals e a presença do anel aromático na maioria dos praguicidas melhora a retenção dos analitos pela interação π - π com o material sorvente (GUAN et al., 2010).

Recentemente, trabalhos da literatura têm demonstrado a eficiência de extração de novas fases extradoras não comerciais para a técnica de DPX. Em um dos trabalhos, a utilização de uma fase extratora de um copolímero de compostos de polianilina e estireno-divinilbenzeno foi utilizado na determinação simultânea de fluoxetina e norfluoxetina em amostras de plasma sanguíneo (CHAVES et al., 2015). Em um outro trabalho, utilizou-se uma mistura de partículas de

C18 com albumina de soro bovino como fase extratora na determinação de drogas em plasma sanguíneo de pacientes esquizofrênicos para o monitoramento terapêutico de drogas (PINTO et al., 2017). Já em outro estudo, a utilização de um material híbrido inorgânico ($\text{Si}_3\text{Py}^+\text{Cl}^-$) como material sorvente na determinação de diferentes desreguladores endócrinos fenólicos em amostras de água mostrou-se bastante eficaz, apresentando maior eficiência de extração quando comparado com uma ponteira contendo material sorvente comercial (CORAZZA et al., 2017). Esses estudos demonstram uma elevada tendência na pesquisa acadêmica focada no desenvolvimento de novos materiais sorventes para serem utilizados como fase extratoras na técnica de DPX, levando em consideração os analitos e a matriz pode-se desenvolver materiais com alta eficiência de extração e com alta seletividade almejando os objetivos da análise.

Como a técnica de DPX é uma variante da técnica de SPE, ela apresenta os mesmos princípios e etapas similares de extração baseados na afinidade do analito com o material sorvente contido no interior da ponteira (KOLE et al., 2011). As etapas do procedimento de extração utilizando a técnica de DPX está demonstrada na Figura 5.

Figura 5 – Etapas do procedimento de extração utilizando a técnica de DPX.



Fonte: Adaptado de PINTO et al. (2015).

Primeiramente, o material sorvente passa por uma etapa chamada de condicionamento com o objetivo de ativar os sítios ativos desse material, deixando-os livres para que ocorra a interação com os analitos da amostra. Essa etapa ocorre com a aspiração de um solvente apropriado para a ativação desses sítios seguido da aspiração de ar para aumentar a área de contato do material com o solvente e finalizado com a eluição do solvente da ponteira. A segunda etapa do procedimento de extração utilizando a técnica de DPX é a aspiração da amostra seguida de aspiração de ar para que ocorra o equilíbrio de sorção dos analitos da amostra com o sorvente contido na ponteira. Em seguida, a amostra é descartada do interior da ponteira e uma etapa opcional pode ser realizada, que é chamada de lavagem (*cleanup*), a fim de remover possíveis interferentes presentes na amostra com a passagem de um solvente ou mistura de solventes apropriado. Por fim, a última etapa é chamada de eluição, na qual um solvente ou mistura de solventes é utilizado a fim de eluir os analitos ligados ao material sorvente para dentro de um frasco, do qual o extrato pode ser injetado diretamente no

instrumento analítico ou evaporado e reconstituído para posterior análise em uma técnica analítica adequada, visando a maior detectabilidade analítica (PINTO et al., 2015; BORDIN et al., 2016).

No desenvolvimento de metodologias analíticas utilizando a técnica de extração com DPX é importante verificar alguns parâmetros que podem influenciar na eficiência de extração dos analitos. Após escolhido o tipo de fase extratora baseado em algumas características presentes nos analitos como a polaridade, acidez, basicidade e grau de ionização para possível extração por troca iônica e também escolhida a massa de material sorvente contida na ponteira (ou realizar uma otimização para a escolha da massa), outros parâmetros que podem influenciar a eficiência de extração utilizando a técnica de DPX podem ser otimizados, tais como:

- Solvente de condicionamento da fase extratora: antes da primeira utilização da ponteira de DPX em extrações é aconselhável que se realize uma etapa chamada de condicionamento do material sorvente presente no interior da ponteira, mas em alguns casos essa etapa não se faz necessária. A principal função dessa etapa é a ativação dos sítios ativos presentes no material para que sua eficiência de extração seja a máxima possível, sendo assim, é necessário verificar qual o solvente ou a mistura de solventes que desempenham melhor essa ativação dos sítios ativos com uma otimização (KOLE et al., 2011; PINTO et al., 2015; BORDIN et al., 2016).

- Número de ciclos e tempo de equilíbrio de extração: o tempo de contato da amostra contendo os analitos com o material sorvente é chamado de tempo de extração, que pode ser otimizado a fim de obter uma maior eficiência de extração, visto que ela está baseada no equilíbrio de sorção do analito com a fase extratora, portanto, essa etapa requer otimização. Nessa otimização, pode-se avaliar a quantidade de ciclos de extração, que é quantidade de vezes que a mesma amostra ou alíquotas da amostra passam pelo processo de extração (PINTO et al., 2015).

- Solvente de *cleanup*: a etapa de limpeza tem como principal objetivo realizar uma limpeza para a remoção de possíveis interferentes presentes na amostra que ficaram aderidos na superfície do material sorvente. A escolha do solvente utilizado nessa etapa é baseada nas características do material sorvente, dos analitos e dos possíveis

interferentes da matriz. Em alguns casos, essa etapa não se faz necessária (KOLE et al., 2011; PINTO et al., 2015).

- Número de ciclos e tempo de equilíbrio de dessorção líquida: a fim de assegurar a completa dessorção dos analitos sorvidos na fase extratora, a etapa de dessorção líquida é de extrema importância e requer uma otimização adequada. Como na otimização do número de ciclos e tempo de equilíbrio de extração, o tempo de contato da fase extratora com o solvente de dessorção deve ser otimizado a fim de obter uma maior eficiência de dessorção, visto que ela está baseada no equilíbrio de dessorção do analito da fase extratora para o solvente. Nessa otimização, pode-se avaliar a quantidade de ciclos de dessorção, que é quantidade de vezes que o mesmo volume do solvente de dessorção é aspirado para o interior da ponteira de DPX (PINTO et al., 2015).

- Solvente ou mistura de solventes de dessorção líquida: na etapa de dessorção líquida é importante utilizar um solvente de dessorção apropriado para atingir elevada dessorção dos analitos do material sorvente para o solvente que será injetado posteriormente em um instrumento analítico para ser analisado, portanto, a escolha desse solvente requer otimização (KOLE et al., 2011; PINTO et al., 2015).

- Efeito da adição de sal: estudos mostram que a adição de sal na amostra melhora a eficiência de extração de compostos, principalmente daqueles com características polares, pois o sal interage com as moléculas de água que circundam as moléculas de analito em amostras aquosas, deixando assim o analito mais livre e suscetível a ser extraído da matriz, melhorando a eficiência de extração do mesmo. Geralmente utiliza-se como sal o cloreto de sódio, pois é um dos sais mais econômicos (ZHAO et al., 2002; PSILLAKIS et al., 2003).

- Efeito do pH da amostra: o pH da amostra é um parâmetro bastante importante nas extrações, pois dependendo da técnica de extração utilizada, é desejável que os analitos presentes na amostra estejam na forma ionizada ou na forma molecular. Baseado no valor do pKa do analito é possível saber em qual pH da amostra em que está contido faz com que ele esteja na sua maior proporção na forma molecular ou na forma ionizada. Sendo assim, se o interesse é extrair um vasto número de analitos com diferentes valores de pKa, é necessária uma otimização para verificar o pH na qual obtém-se uma eficiência de extração

satisfatória para todos os analitos (BEDENDO et al., 2012; CARASEK et al., 2015).

As análises dos extratos provenientes da extração pela técnica de DPX podem ser realizadas através de diferentes técnicas, sendo a cromatografia líquida e a cromatografia gasosa as mais utilizadas (PINTO et al., 2015). A técnica de DPX aliada a técnicas cromatográficas tem sido muito aplicada em análises forenses, ambientais e alimentares em um vasto número de matrizes diferentes como mostrado na Tabela 5.

Tabela 5 – Trabalhos reportados da literatura e suas aplicações em análises utilizando a técnica de DPX no preparo de amostra.

Análito	Matriz	Técnica analítica	Tipo de material sorvente	Referência
Anfetaminas, cocaína, antidepressivos tricíclicos, meperidina, metadona e fenciclidina	Urina	GC-MS	DPX-CX	ELLISON et al., 2009
Praguicidas organoclorados e organofosforados	Alimentos	GC-MS	DPX-WAX	GUAN et al., 2009
Metanfetaminas e anfetamina	Sangue	GC-MS	DPX-C18	HASEGAWA et al., 2007
Cocaína e nicotina	Mecônio	GC-MS	DPX-CX	MOZANER et al., 2014
Opiáceos	Humor vítreo	GC-MS	DPX-CX	HASEGAWA et al., 2011
Explosivos	Água	LC-UV/vis	DPX-RP	GUAN et al., 2014
Canabinoides e seus metabólitos	Urina	LC-MS/MS	DPX-WAX	ANDERSSON et al., 2016
Praguicidas organoclorados, organofosforados e fungicidas	Frutas e vegetais	GC-MS	DPX-RP	GUAN et al., 2010
Antibióticos aminoglicosídeos	Tecidos	LC-MS/MS	DPX-CX	LEHOTAY et al., 2013

Fonte: Autoria própria (2018).

De um modo geral, a técnica de extração de DPX apresenta diversas vantagens, tais como o uso de pipetadores multicanais para aumentar a frequência analítica, o fluxo do líquido pode ser bidirecional, contaminação é menos recorrente pois as ponteiras são descartáveis. Como são utilizadas menores massas de material sorvente, pequenas quantidades de amostra e de solvente orgânico são requeridas na etapa de extração, além de que o sistema de extração pode ser automatizado para atender grandes demandas de análises como em grandes laboratórios, o que permite também análises mais precisas e exatas (GUAN et al., 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O principal objetivo do trabalho consiste no desenvolvimento de um procedimento eficiente de preparo de amostra para a extração de praguicidas em amostras de urina humana utilizando a extração em ponteiras descartáveis (DPX) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) como técnica de separação e detecção dos compostos de interesse.

3.2 Objetivos específicos

- Otimizar a separação e detecção dos analitos no GC-MS variando as temperaturas do injetor, da coluna, da rampa de aquecimento, da fonte de íons e da interface;
- Otimizar os parâmetros da técnica de DPX para a extração dos analitos em amostras de urina humana como o modo de ciclo de extração, tempo e número de ciclos de extração, tempo e número de ciclos de dessorção, solvente ou mistura de solventes para a dessorção líquida e limpeza e condicionamento entre as extrações;
- Determinar os parâmetros de validação da metodologia desenvolvida tais como a faixa linear de trabalho, coeficiente de determinação, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão intra-dia e precisão inter-dia.

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais e reagentes

Uma mistura de padrões analíticos dos analitos pertencentes ao grupo dos carbamatos foi adquirida da Sigma-Aldrich com concentração de 100 mg L⁻¹ em metanol. Os outros padrões dos analitos foram adquiridos também da Sigma-Aldrich e com estes foram preparadas soluções estoque padrão individuais de cada analito com concentração de 100 mg L⁻¹ em metanol. A partir dessas soluções, foi preparada uma solução de trabalho em metanol contendo a mistura de padrões de todos os analitos com concentração de 5 mg L⁻¹ dos analitos pertencentes ao grupo dos carbamatos e de 10 mg L⁻¹ dos outros analitos. O metanol padrão HPLC foi adquirido na J.T. Baker, o acetato de etila padrão HPLC/GC na Sigma-Aldrich e a acetonitrila padrão HPLC na Merck. O sulfato de sódio anidro utilizado no interior do frasco de eluição da amostra foi adquirido da Vetec. As ponteiros descartáveis de 1 mL do tipo DPX-RP 20 mg e as ponteiros descartáveis de 5 mL sem material sorvente foram adquiridas da DPX Labs, todas elas já contendo os filtros superiores e inferiores. A microseringa de 10 µL foi adquirida da Hamilton. A seringa descartável com capacidade de 5 mL foi adquirida da Bd Solomed. A água ultrapura utilizada nos experimentos foi purificada por um aparelho *Mega purity* (Billerica, EUA).

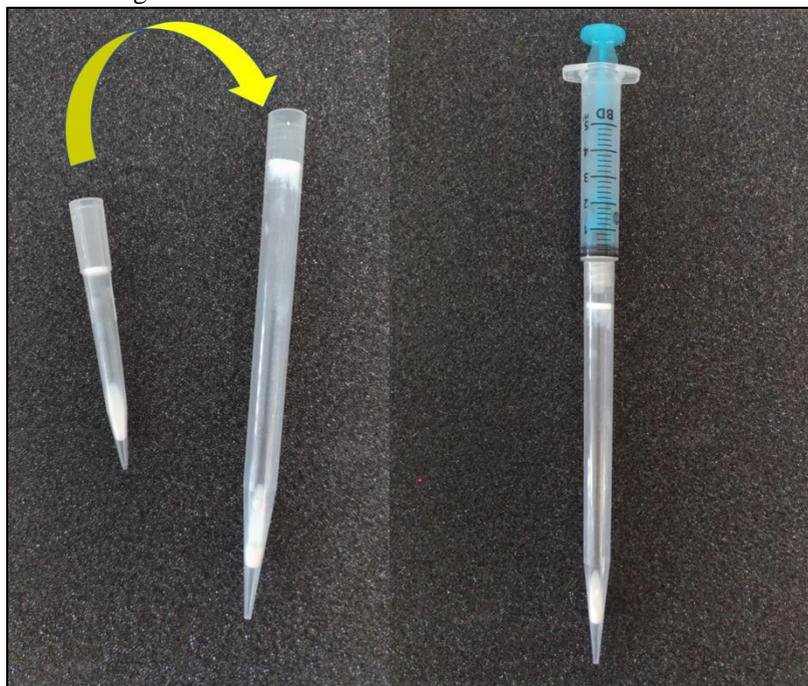
4.2 Amostras de urina

Inicialmente, os ensaios de otimização foram realizados em amostras de água ultrapura e os analitos foram adicionados a essas amostras. Posteriormente, com todos os parâmetros já otimizados, o método foi validado em amostras de urina de integrantes do grupo de pesquisa que foram coletadas em frascos de vidro de 40 mL e estocadas sob refrigeração a 4 °C até o momento da utilização. A amostra foi utilizada sem tratamento prévio e na temperatura ambiente, na qual os analitos também foram adicionados a essas amostras.

4.3 Preparo da ponteira descartável

Para o desenvolvimento da metodologia foi utilizado uma ponteira descartável de 5 mL de capacidade contendo nenhum tipo de material sorvente no seu interior, na qual foi primeiramente retirado o filtro superior dessa ponteira e em seguida foi transferido os 20 mg de material sorvente proveniente da ponteira descartável de 1 mL de capacidade do tipo DPX-RP conforme mostrado na Figura 6. Após a transferência do material sorvente, o filtro foi colocado novamente na posição superior da ponteira descartável de 5 mL de capacidade. Posteriormente, a ponteira foi acoplada a uma seringa descartável de 5 mL de capacidade para ser utilizada nas extrações.

Figura 6 – Procedimento do preparo da ponteira de DPX e acoplamento com a seringa.



Fonte: Autoria própria (2018).

4.4 Instrumentação e condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas da Shimadzu

e modelo GC-MS-QP 2010 Plus. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna da Restek e modelo Rtx®-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura do filme). O gás de arraste foi composto de hélio ultrapuro em fluxo constante de 1 mL/min. A temperatura do injetor foi 250 °C e a temperatura inicial da coluna foi 50 °C mantida por 1 min, depois a temperatura foi aumentada até 200 °C na taxa de 10 °C/min e após atingida essa temperatura foi aumentada novamente até 255 °C na taxa de 7 °C/min, totalizando 24 min de corrida cromatográfica. O volume de injeção foi de 1 µL no modo *splitless* realizada manualmente. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização por impacto de elétrons em 70 eV. A temperatura da fonte de íons foi fixada em 230 °C e da interface em 280 °C, sendo o tempo de corte do solvente de 2,5 min. A identificação dos analitos foi confirmada com a injeção dos padrões analíticos e com a presença dos íons majoritários (pico base) nos espectros de massa. A quantificação dos analitos foi realizada no modo SIM utilizando o íon de maior intensidade. As informações dos íons monitorados para a identificação e quantificação dos analitos estão mostradas na Tabela 6.

Tabela 6 – Informações dos íons em relação às razões massa/carga dos analitos.

Analito	Íons majoritários para a identificação (m/z)	Íon usado na quantificação(m/z)
Oxamil	42, 69, 72	72
Propoxur	27, 110, 152	110
Carbofurano	122, 149, 164	164
3-hidroxicarbofurano	137, 147, 180	147
Carbaril	115, 116, 144	144
Metiocarbe	109, 153, 168	168
Terbufós	57, 97, 231	97
Metilparation	109, 125, 263	109
Malation	125, 127, 173	173
Clorpirifós	97, 197, 199	97
Endosulfano	195, 197, 241	241

Fonte: Autoria própria (2018).

4.5 Otimizações da técnica de extração em ponteiras descartáveis

4.5.1 Condições fixadas inicialmente

O propósito do trabalho foi desenvolver uma metodologia para ser utilizada em laboratórios forenses, em que o fator tempo é de extrema importância. Sendo assim, nesse trabalho optou-se por utilizar ponteiras de DPX comerciais, sem a necessidade de preparação da ponteira com algum tipo de material sorvente não comercial antes das análises, o que levaria mais tempo e também possíveis erros na pesagem do material, já que a massa é em torno de poucos miligramas. Portanto, a ponteira comercial escolhida foi a DPX-RP de 5 mL com 20 mg de fase extratora, ideal para a extração de compostos com características apolares, como os praguicidas.

Visando limites de quantificação baixos, o volume de dessorção foi fixado em 250 µL, quantidade mínima suficiente para cobrir a massa de material sorvente de 20 mg na etapa de dessorção líquida, pois quanto menor o volume de solvente de dessorção, maior a concentração do analito no extrato e consequentemente menores limites são atingidos. O volume da amostra também foi fixado inicialmente em 5 mL, mas na etapa da obtenção das curvas de calibração para cada analito o volume de amostra de urina utilizado foi apenas de 100 µL.

4.5.2 Otimização do modo de ciclo de extração

O modo de ciclo de extração é um fator importante que visa a máxima eficiência de extração dos analitos, para isso, é necessária uma otimização para saber qual modo é mais eficiente para alcançar o objetivo da análise. Para a técnica de extração utilizada nesse trabalho, existe na literatura dois modos de ciclo de extração, o primeiro e mais comum é quando uma alíquota de certo volume da amostra é aspirada para dentro da ponteira e depois é descartada seguindo para a aspiração de uma nova alíquota da mesma amostra, e o segundo modo, menos comum, é a aspiração de todo o volume da amostra para dentro da ponteira e depois é descartada de volta no mesmo frasco da amostra que segue para novas aspirações por vários ciclos conforme o trabalho de Konatu et al. (2017). Portanto, nesse estudo foi feito um planejamento de seis experimentos abrangendo os modos de ciclo de extração. Estes ensaios foram realizados em triplicata conforme a Tabela 7.

Tabela 7 – Planejamento da otimização do modo de ciclo de extração.

Método	Modo de ciclo	Tempo de equilíbrio (s)
A	5 ciclos com 1 mL	60
B	5 ciclos com 1 mL	30
C	5 ciclos com 1 mL	0
D	Todo volume de 5 mL por 10 vezes	0
E	Todo volume de 5 mL por 20 vezes	0
F	Todo volume de 5 mL por 30 vezes	0

Fonte: Autoria própria (2018).

4.5.3 Otimização do(s) solvente(s) da dessorção líquida

Para se obter uma boa eficiência de dessorção dos analitos foi realizada uma otimização do(s) solvente(s) empregado(s) na etapa de dessorção líquida, na qual utilizou-se o planejamento de superfície triangular. A extração foi realizada com 5 ciclos de 1 mL por 30 segundos de equilíbrio e dessorção líquida constituída de 1 ciclo com 250 μ L do solvente por 30 segundos. Sendo assim, os solventes testados foram acetonitrila, metanol e acetato de etila em razões distintas

conforme mostrado na Tabela 8. O experimento 10 foi realizado em triplicata.

Tabela 8 – Planejamento de superfície triangular para a escolha do solvente ou mistura de solventes na etapa de dessorção líquida.

Experimento	Metanol (%)	Acetato de etila (%)	Acetonitrila (%)
1	100	0	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	50	50	0
5	50	0	50
6	0	50	50
7	66,66	16,67	16,67
8	16,67	66,66	16,67
9	16,67	16,67	66,66
10 (ponto central)	33,33	33,33	33,33

Fonte: Autoria própria (2018).

4.5.4 Otimização do número de ciclos e tempo de extração

Para essa otimização foram realizados nove experimentos com o planejamento *Doehlert*, na qual o número de ciclos de extração foi variado na faixa de 3 a 7 ciclos e o tempo de equilíbrio foi variado de 0 a 60 segundos conforme mostrado na Tabela 9. A dessorção líquida foi constituída de 1 ciclo com 250 μL de acetato de etila por 30 segundos de equilíbrio.

Tabela 9 – Planejamento *Doehlert* para a otimização do número de ciclos e tempo de extração.

Experimento	Número de ciclos	Tempo (s)
1	5	0
2	3	15
3	3	45
4	5	60
5	7	45
6	7	15
7	5	30
8	5	30
9	5	30

Fonte: Autoria própria (2018).

4.5.5 Otimização do número de ciclos e tempo de dessorção

Para essa otimização também foram realizados nove experimentos com o planejamento *Doehlert*, na qual o número de ciclos de dessorção foi variado na faixa de 1 a 5 ciclos e o tempo de equilíbrio foi variado de 15 a 45 segundos conforme mostrado na Tabela 10. A extração foi realizada com 5 ciclos de 30 segundos de equilíbrio.

Tabela 10 – Planejamento *Doehlert* para a otimização do número de ciclos e tempo de dessorção.

Experimento	Número de ciclos	Tempo (s)
1	1	30
2	2	15
3	4	15
4	5	30
5	4	45
6	2	45
7	3	30
8	3	30
9	3	30

Fonte: A autoria própria (2018).

4.5.6 Otimização da etapa de limpeza e de condicionamento

Antes de iniciar a etapa de extração com um material sorvente é importante a etapa de condicionamento desse material para a ativação dos sítios ativos e entre as extrações é importante também uma limpeza adequada para proporcionar as mesmas condições iniciais para todas as extrações. Sendo assim, a etapa de limpeza e condicionamento foi estudada sob condições otimizadas de extração e dessorção líquida, na qual foram avaliados os solventes metanol e acetato de etila. Para cada solvente foi variado o número de ciclos de limpeza de 1 a 5 ciclos com 10 segundos de equilíbrio utilizando 500 μL de solvente.

4.6 Validação da metodologia desenvolvida

O método proposto nesse trabalho foi validado a partir da obtenção de curvas de calibração para cada analito na matriz urina utilizando as condições otimizadas da etapa de preparo de amostra. Para a obtenção das curvas de calibração foi utilizado apenas 100 μL de amostra de urina humana, já que estudos na literatura apontam concentrações elevadas desses analitos em casos fatais de envenenamento por praguicidas. Sendo assim, o volume de amostra de urina foi diluído com a adição de 4.900 μL de água ultrapura, resultando

em um fator de diluição de 50 vezes. Cada curva de calibração foi obtida através de 5 níveis de concentração, na qual cada ponto foi realizado em triplicata. A partir das curvas de calibração obteve-se os seguintes parâmetros de mérito: faixa linear de trabalho, coeficiente de determinação (r^2), limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) para cada analito. Os valores do LOQ foram obtidos através do primeiro ponto da curva de calibração de cada analito e os valores do LOD representam o valor de LOQ dividido por 3,3.

Ensaio de recuperação em três níveis diferentes de fortificação para cada analito foram realizados em amostras de urina humana para a avaliação da precisão e da exatidão do método desenvolvido nesse trabalho. A exatidão foi avaliada em termos de recuperação, sendo aceitos valores na faixa de 60 a 120%. A precisão foi avaliada através dos valores de desvio padrão relativo (RSD), sendo aceitos valores menores que 20%. A precisão intra-dia foi avaliada em três níveis diferentes de fortificação e no mesmo dia. Já a precisão inter-dia foi avaliada em apenas um nível de fortificação e em 3 dias diferentes (RIBANI et al., 2004; SOFT/AAFS, 2006; SANCO, 2013).

4.7 Programas utilizados na análise dos dados

Para a análise dos dados gerados nos experimentos de otimização do método desenvolvido nesse trabalho foram utilizados os seguintes programas: Microsoft Excel 2016 e STATISTICA 8.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização da separação cromatográfica

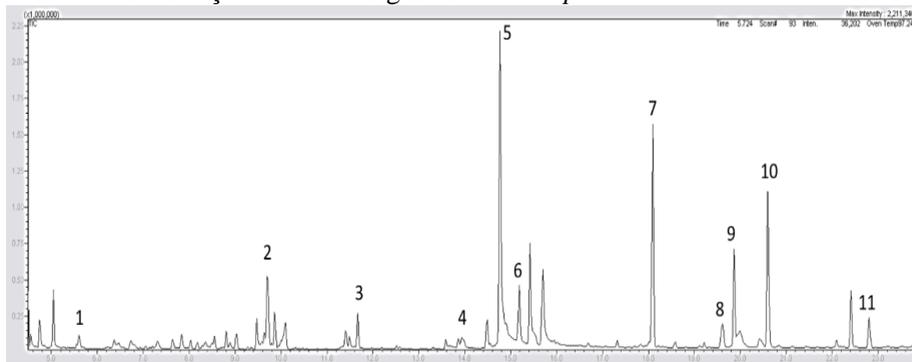
Inicialmente, antes da otimização da etapa de extração utilizando a técnica de DPX, foi realizada a otimização da separação cromatográfica no cromatógrafo gasoso. Para isso, tomou-se como base o trabalho de Luzardo *et al.* (2015), no qual ele descreve as condições cromatográficas para a separação de uma vasta gama de praguicidas em um GC-MS/MS. As condições foram inseridas no equipamento e foi injetado 1 μ L da mistura de padrões dos analitos desse trabalho. Com a análise do primeiro cromatograma obtido foi possível chegar à conclusão que ajustes deveriam ser feitos para adaptar as condições cromatográficas para os analitos deste trabalho. Sendo assim, algumas variáveis tais como as temperaturas do injetor, da coluna, da rampa de aquecimento, da fonte de íons e da interface foram alteradas e testadas até chegar nas condições cromatográficas ótimas, na qual os tempos de retenção dos analitos estão mostrados na Tabela 11 e o cromatograma obtido da separação cromatográfica na Figura 7.

Tabela 11 – Tempos de retenção dos analitos obtidos na separação cromatográfica.

Analito	Tempo de retenção (min)
Oxamil	5,5
Propoxur	9,7
Carbofurano	11,6
3-hidroxicarbofurano	13,9
Carbaril	14,7
Metiocarbe	15,1
Terbufós	18,0
Metilparation	19,6
Malation	20,4
Clorpirifós	20,6
Endosulfano	22,8

Fonte: Autoria própria (2018).

Figura 7 – Cromatograma da separação cromatográfica no GC-MS no modo SCAN com a injeção de 1 μL da mistura de padrões com concentração de 5 e 10 mg L^{-1} no modo *splitless*.



*Legenda: (1) Oxamil, (2) Propoxur, (3) Carbofurano, (4) 3-hidroxicarbofurano, (5) Carbaril, (6) Metiocarbe, (7) Terbufós, (8) Metilparation, (9) Malation, (10) Clorpirifós, (11) Endosulfano.

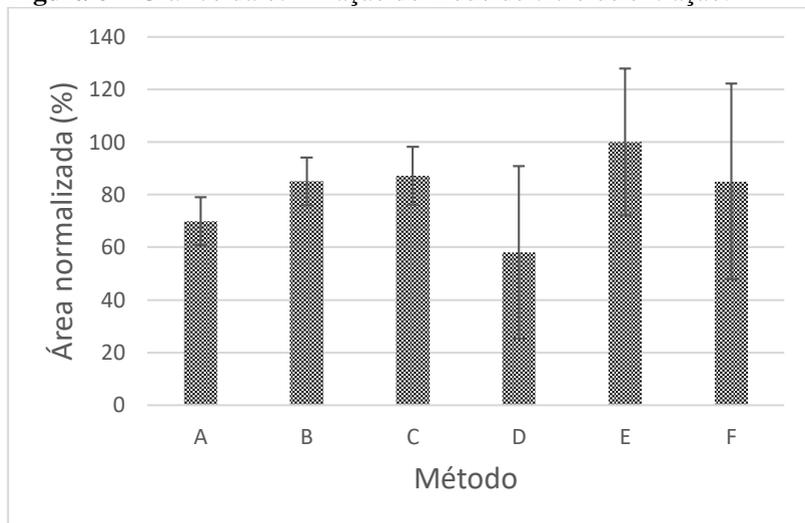
Fonte: Autoria própria (2018).

5.2 Otimizações da técnica de extração em ponteiras descartáveis

5.2.1 Otimização do modo de ciclo de extração

O objetivo nesse estudo era avaliar a eficiência de extração desempenhadas por dois métodos distintos reportados na literatura para a execução do ciclo de extração. Com os experimentos desse estudo (Tabela 7) e com a análise dos resultados mostrados na Figura 8, é possível dizer que o melhor resultado em relação à área normalizada para todos os métodos é obtido através do método E, mas como o erro associado a esse método é muito grande, assim como no método D e F que são métodos realizados de forma similar, optou-se por escolher o método B para seguir o trabalho, já que apresenta um resultado próximo do obtido pelo método E em relação à área normalizada e também o erro associado a esse método é o menor de todos, o que resulta em uma maior precisão nos resultados. Sendo assim, o modo de ciclo de extração utilizado no restante do trabalho foi a aspiração de 1 mL da amostra para dentro da ponteira e depois de 30 segundos de equilíbrio a amostra é descartada repetindo esse procedimento até completar 5 ciclos de extração.

Figura 8 – Gráfico da otimização do modo de ciclo de extração.



*Condições DPX: 5 mL de água ultrapura fortificada com 150 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos e dessorção de 1 ciclo com 250 μL de metanol por 30 segundos.

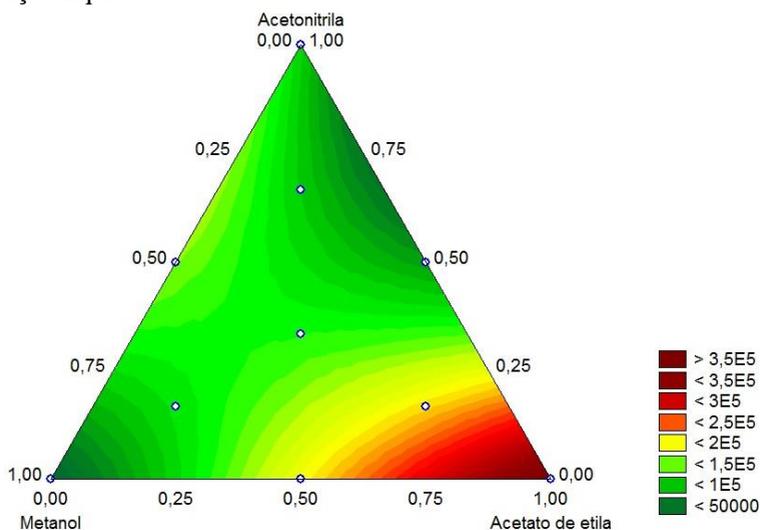
Fonte: Autoria própria (2018).

5.2.2 Otimização do(s) solvente(s) da dessorção

Nesse estudo foi avaliado a eficiência da dessorção líquida de três solventes orgânicos distintos através do planejamento da superfície triangular. Os solventes testados foram a acetonitrila, metanol e acetato de etila. A Figura 9 mostra o resultado dessa otimização, na qual apresentou uma função quadrática com coeficiente de determinação igual a $r^2 = 0,9709$, o que representa um resultado bastante satisfatório para esse tipo de superfície resposta, pois revela uma boa correlação entre os dados experimentais e os valores preditos (NETO et al., 2010). Através do resultado apresentado na Figura 9, é possível afirmar que o acetato de etila desempenhou uma maior eficiência de dessorção líquida dos analitos, já que a na região correspondente a 100% desse solvente a coloração é vermelha. Essa coloração representa a região com o maior valor obtido da média aritmética das áreas dos picos dos analitos, ou seja, com o acetato de etila foi obtido uma maior quantidade de analito dessorvido da fase extratora, o que representa uma maior eficiência de dessorção, sendo então esse solvente escolhido para a etapa de

dessorção líquida do restante do trabalho. Esse solvente está de acordo com o resultado esperado baseado na polaridade dos solventes testados, pois o acetato de etila possui a menor polaridade entre eles, ou seja, característica semelhante aos analitos utilizados nesse trabalho que são na sua grande maioria apolares, o que proporcionou a melhor eficiência de dessorção como mostrado no resultado dessa otimização pela Figura 9.

Figura 9 – Superfície resposta da otimização do(s) solvente(s) de dessorção líquida.



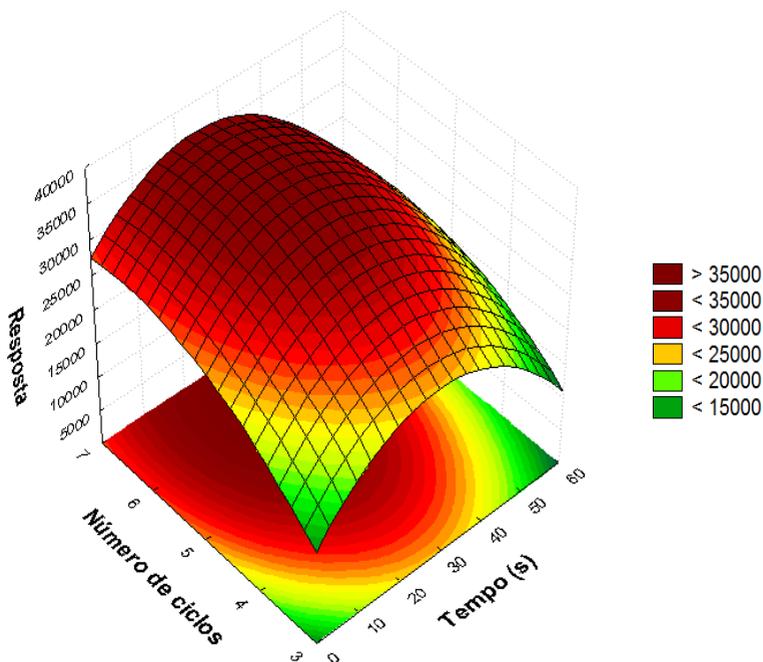
*Condições DPX: 5 mL de água ultrapura fortificada com 150 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, extração com 5 ciclos de 1 mL por 30 segundos e dessorção de 1 ciclo com 250 μL de diferentes solventes por 30 segundos.

Fonte: Autoria própria (2018).

5.2.3 Otimização do número de ciclos e tempo de extração

Nessa otimização foi estudado a etapa de extração, variando-se o número de ciclos de extração e o tempo de equilíbrio da amostra com a fase extratora, visando-se a maior eficiência de extração. O resultado desse estudo foi alcançado com uma otimização multivariada através do planejamento *Doehlert*, na qual a superfície de resposta obtida está mostrada na Figura 10, em que apresentou uma função quadrática com coeficiente de determinação igual a $r^2 = 0,9756$, o que representa um resultado bastante satisfatório para esse tipo de superfície resposta, pois quanto mais próximo de 1, melhor é o ajuste do modelo aos resultados obtidos experimentalmente (TEÓFILO e FERREIRA, 2006). Através desta figura, pode-se observar que com 5 ciclos de extração de 30 segundos obteve-se um resultado excelente, já que a intercepção dessas duas condições está localizada em uma região de coloração vermelha intensa, na qual indica as condições que se obtém o maior valor de média geométrica de todos os analitos. Sendo assim, estas condições foram escolhidas para o procedimento de extração neste trabalho.

Figura 10 – Superfície resposta obtida para a otimização do número de ciclos e tempo de extração.



*Condições DPX: 5 mL de água ultrapura fortificada com 150 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, extração com número de ciclos e tempo de equilíbrio variados e dessorção de 1 ciclo com 250 μL de acetato de etila por 30 segundos.

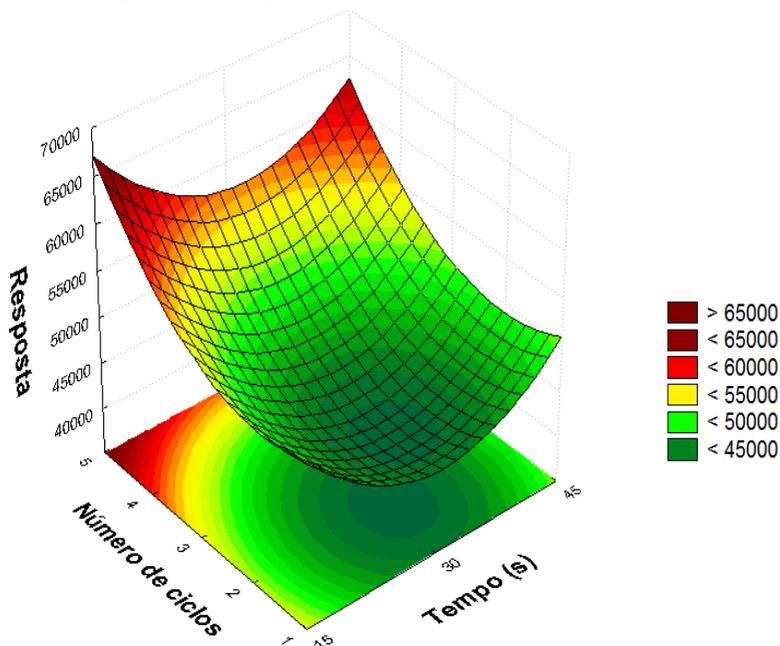
Fonte: Autoria própria (2018).

5.2.4 Otimização do número de ciclos e tempo de dessorção

A otimização da etapa de dessorção líquida também foi realizada com uma otimização multivariada através do planejamento *Doehlert*, sendo o número de ciclos e tempo de equilíbrio de dessorção as variáveis. A Figura 11 mostra a superfície de resposta obtida através desse experimento a qual apresentou uma função quadrática com coeficiente de determinação igual a $r^2 = 0,8308$, valor aceitável para esse tipo de planejamento (TEÓFILO e FERREIRA, 2006). Como pode ser observado nessa figura, existem dois máximos, ou seja, duas maneiras de combinação entre as variáveis que resultam em um melhor

resultado, sendo eles 5 ciclos de 15 segundos e 5 ciclos de 45 segundos, mas a combinação de 5 ciclos de 15 segundos foi escolhida como condição para o procedimento de dessorção líquida para o restante do trabalho pois ela resulta em uma maior frequência analítica, ou seja, menor tempo para a realização da etapa de preparo de amostra.

Figura 11 – Superfície resposta obtida para a otimização do número de ciclos e tempo de dessorção.



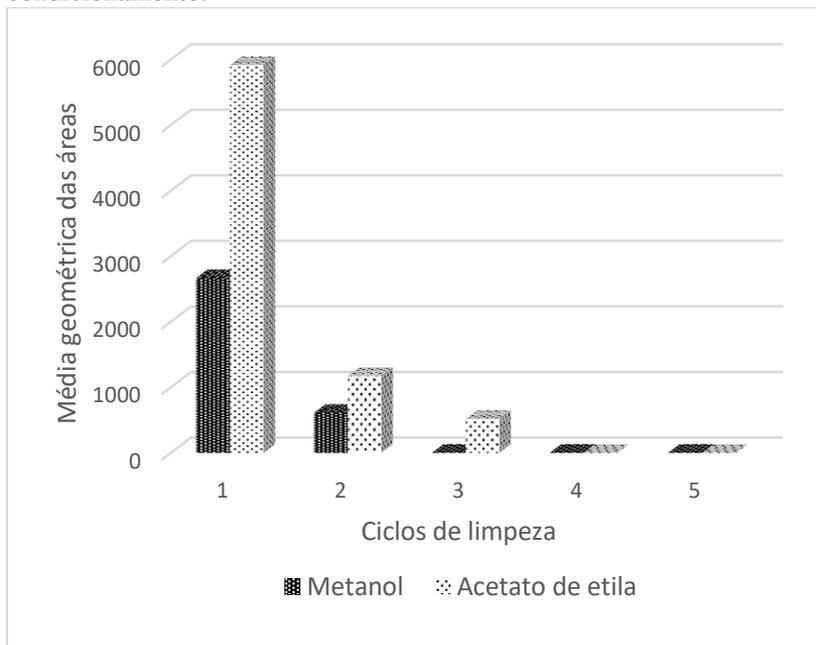
*Condições DPX: 5 mL de água ultrapura fortificada com 150 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, extração com 5 ciclos por 30 segundos de equilíbrio e dessorção em 250 μL de acetato de etila com diferentes números de ciclos e tempos de equilíbrio.

Fonte: Autoria própria (2018).

5.2.5 Otimização da etapa de limpeza e de condicionamento

Nessa última otimização, foi avaliado a etapa de limpeza após o procedimento de extração e de condicionamento para uma nova extração. O resultado desse estudo está mostrado na Figura 12, na qual pode-se perceber que com três ciclos de metanol já se obtêm as condições desejadas para um novo ciclo de extração, ou seja, a fase extratora não contém mais resíduos de analitos da extração anterior e os sítios ativos do material estão condicionados para um novo ciclo de extração. Sendo assim, 3 ciclos com 500 μL de metanol por 10 segundos foram utilizados para a limpeza e condicionamento da fase extratora contida na ponteira de DPX.

Figura 12 – Gráfico da otimização da etapa de limpeza e de condicionamento.



*Condições DPX: 5 mL de água ultrapura fortificada com 150 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, extração com 5 ciclos por 30 segundos de equilíbrio e desorção com 5 ciclos de 15 segundos com 250 μL de acetato de etila.

Fonte: Autoria própria (2018).

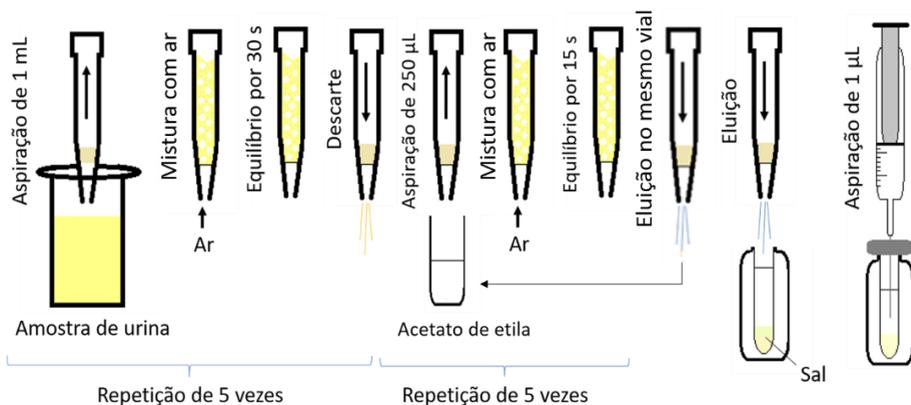
5.2.6 Estudo da adição de sal no frasco contendo o extrato

No interior do frasco que era eluído o extrato da extração com DPX havia a formação de duas fases provenientes da insolubilidade do acetato de etila (solvente de dessorção) com a fase aquosa (água ou urina) que por ventura era eluída junto com o solvente orgânico. Esse fato foi prejudicial na etapa de injeção no cromatógrafo, pois invés de injetar somente o solvente orgânico, parte da fase aquosa também poderia estar sendo injetada. Portanto, para minimizar esse problema, no interior do frasco foi inserido cerca de 100 mg de sulfato de sódio anidro com a função de secar a fase aquosa, deixando livre somente a fase orgânica para a injeção. Outra função que o sal exerce é de proporcionar o efeito *salting out*, que é quando o sal interage com as moléculas de água deixando livres as moléculas dos analitos, pois a solubilidade destes na água é diminuída e conseqüentemente migram para a fase orgânica (ZHAO et al., 2002; PSILLAKIS et al., 2003), aumentando assim a quantidade de analito injetado no cromatógrafo, o que foi notado claramente no cromatogramas com o aumento das áreas dos picos.

5.3 Procedimento de preparo de amostra otimizado

O procedimento de preparo de amostra otimizado desenvolvido nesse trabalho está demonstrado na Figura 13. As extrações foram realizadas utilizando 100 μL de amostra de urina que foi diluída com a adição de 4.900 μL de água ultrapura dentro de um frasco, totalizando um volume final de 5 mL. Para o procedimento de extração, foi realizado 5 ciclos, na qual cada ciclo de extração constituiu na aspiração de 1 mL da amostra, seguido da aspiração de ar, equilíbrio por 30 segundos e eluição da amostra para o resíduo. No procedimento de dessorção líquida, também foi realizado 5 ciclos, em que cada ciclo constituiu na aspiração de 250 μL de acetato de etila presente em um frasco pequeno, seguido da aspiração de ar, equilíbrio de 15 segundos e eluição do solvente no mesmo frasco para o início de um novo ciclo e ao final do quinto ciclo o extrato foi eluído em um outro frasco contendo 100 mg de sulfato de sódio anidro para posterior análise por GC-MS. O tempo total do procedimento de preparo de amostra é de cerca de 4 minutos. Após cada procedimento de extração, a ponteira foi limpa e condicionada com 500 μL de metanol por 5 ciclos de 10 segundos.

Figura 13 – Diagrama do procedimento de preparo de amostra otimizado do método desenvolvido nesse trabalho.



Fonte: Autoria própria (2018).

5.4 Validação da metodologia desenvolvida

Após a otimização de todos os parâmetros da metodologia desenvolvida, o método proposto nesse trabalho foi validado a partir da obtenção de curvas de calibração na matriz com duas faixas lineares distintas conforme mostrado na Tabela 12.

Tabela 12 – Equação da reta, faixa linear de trabalho, coeficiente de determinação, limite de detecção e de quantificação para os analitos.

Analito	Equação da reta	Faixa linear de trabalho (µg L⁻¹)	r²	LOD (µg L⁻¹)	LOQ (µg L⁻¹)
Oxamil	$y = 236,47x + 154,26$	2,5 - 35	0,9947	0,76	2,5
Propoxur	$y = 2551x + 7148$	2,5 - 35	0,9917	0,76	2,5
Carbofurano	$y = 469,32x + 727,11$	2,5 - 35	0,9917	0,76	2,5
3-hidroxicarbofurano	$y = 1412,30x - 2254,9$	2,5 - 35	0,9965	0,76	2,5
Carbaril	$y = 12488x - 3952,60$	2,5 - 35	0,9966	0,76	2,5
Metiocarbe	$y = 1008x + 2022,90$	2,5 - 35	0,9915	0,76	2,5
Terbufós	$y = 2260,90x + 10647$	5,0 - 70	0,9924	1,52	5,0
Metilparation	$y = 940,10x - 4562,60$	5,0 - 70	0,9955	1,52	5,0
Malation	$y = 1342,50x - 6382,40$	5,0 - 70	0,9911	1,52	5,0
Clorpirifós	$y = 2287,60x - 10442$	5,0 - 70	0,9958	1,52	5,0
Endosulfano	$y = 119,64x + 798,11$	5,0 - 70	0,9982	1,52	5,0

Fonte: Autoria própria (2018).

A partir da Tabela 12 pode-se perceber que os valores do coeficiente de determinação obtidos para os analitos foram satisfatórios estando todos acima de 0,9911. Os valores de LOD's obtidos para os analitos foram de 0,76 e 1,52 $\mu\text{g L}^{-1}$ e os valores de LOQ's foram de 2,5 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Para a avaliação da exatidão e da precisão do método desenvolvido foram realizados ensaios de recuperação com a adição de diferentes concentrações de analitos na amostra de urina na qual os resultados estão mostrados na Tabela 13. Os experimentos foram realizados em triplicata em cada nível de fortificação.

Tabela 13 – Resultados obtidos através de ensaios de recuperação para a avaliação da exatidão e precisão do método desenvolvido.

Analito	Adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%) (n=3)	Precisão (RSD, %, n=3 e n=9)	
			Intra- dia	Inter- dia
Oxamil	5	75	13,1	-
	15	87	1,2	7,6
	35	109	5,7	-
Propoxur	5	110	6,6	-
	15	117	7,3	4,9
	35	118	4,7	-
Carbofurano	5	68	5,6	-
	15	101	3,9	10,2
	35	118	13,6	-
3-hidroxicarbofurano	5	94	6,8	-
	15	92	5,1	6,9
	35	118	3,7	-
Carbaril	5	104	3,1	-
	15	97	12,9	9,8
	35	106	4,2	-
Metiocarbe	5	115	15,3	-
	15	92	8,2	8,8
	35	89	6,4	-
Terbufós	10	90	6,4	-
	30	93	7,6	10,8
	70	93	2,5	-
Metilparation	10	79	7,7	-
	30	63	12,6	12,3
	70	83	2,0	-
Malation	10	87	4,7	-
	30	71	6,8	13,1
	70	71	4,7	-
Clorpirifós	10	115	1,0	-
	30	69	6,5	10,2
	70	91	7,5	-
Endosulfano	10	75	1,6	-
	30	99	2,4	11,0
	70	83	0,7	-

Fonte: Autoria própria (2018).

Conforme a Tabela 13, pode-se perceber que a recuperação variou de 63 a 118%, o que está de acordo com a faixa estabelecida de recuperação para métodos que utilizam microextração. A faixa de precisão intra-dia variou de 0,7 a 15,3% e a de inter-dia de 4,9 a 13,1%, o que está de acordo também para os valores de precisão que devem ser menores que 20%. Sendo assim, o método desenvolvido nesse trabalho mostrou-se válido para a faixa linear de trabalho utilizada para todos os analitos estudados. É importante destacar também que a mesma ponteira pode ser utilizada em cerca de 15 ciclos completos de extração e dessorção conforme foi notado com o desenvolvimento desse trabalho, ou seja, a reprodutibilidade se mantém constante durante várias extrações, não necessitando trocar a ponteira em cada nova amostra, gerando assim uma grande economia e também geração de menos resíduos.

5.5 Comparação do método proposto com métodos descritos na literatura

O método desenvolvido nesse trabalho também foi comparado com outros métodos reportados na literatura na determinação de praguicidas em fluídos biológicos, conforme mostrado na Tabela 14.

Através dessa tabela, pode-se constatar que o método desenvolvido nesse trabalho utiliza um menor volume de amostra em relação aos outros métodos, o que é um fator bastante importante já que muitas vezes o volume de amostra disponível para análises toxicológicas forenses é muito reduzido.

Outro fator importante é o tempo total de preparo de amostra, enquanto o método desenvolvido nesse trabalho necessita apenas de 4 min para realizar essa etapa, os outros métodos necessitam de muito mais tempo como por exemplo mais de 15 minutos e podendo necessitar de mais de 2 horas para executar essa etapa.

Em relação aos limites alcançados pelo método desenvolvido nesse trabalho, é possível dizer que foram bem satisfatórios levando em consideração o volume baixo de amostra e o instrumento de separação e detecção utilizados. É importante também destacar que em análises toxicológicas forenses o interesse maior está na identificação da substância que causou a intoxicação do que na quantificação da mesma na amostra.

Tabela 14 – Comparação do método desenvolvido com outros reportados na literatura.

Método	Matriz	Volume de amostra (mL)	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Tempo de preparo de amostra (min)	Referência
DPX e GC-MS	Urina	0,1	2,5 - 70	0,76 – 1,52	2,5 – 5,0	4	Esse trabalho
SPE e GC-IT-MS/MS e UHPLC-QqQ-MS/MS	Urina	5	0,1 - 100	0,001 – 1,048	0,003 – 3,494	>120	CAZORLA-REYES et al., 2011
SPME e GC/ECD/FPD	Urina	3	0,1 - 10	0,1 – 0,5	0,3 – 1,5	30	LÓPEZ et al., 2011
SPE e GC-MS	Sangue	1	130 - 5000	40 - 90	130 – 170	>15	PARK et al., 2001
LLE e GC-MS/MS e LC-ESI/MS/MS	Sangue	2	0,5 - 500	-	1 - 50	>45	LUZARDO et al., 2015
SPE e GC-MS- μ ECD	Sangue	0,5	50 - 5000	2,46	7,46	>45	VALENTE et al., 2015

Fonte: Autoria própria (2018).

6 CONCLUSÕES

A metodologia inédita proposta por esse trabalho para a extração de praguicidas em amostras de urina humana em casos de envenenamento utilizando a técnica de extração em ponteiras descartáveis (DPX) mostrou-se rápida e eficiente.

Os parâmetros de validação do método desenvolvido apresentaram valores aceitos pelas normas de validação, tais como coeficientes de determinação superiores a 0,9911 para todos os analitos estudados, os ensaios de recuperação apresentaram valores na faixa de 63 a 118%, a precisão intra-dia variou de 0,7 a 15,3% e a de inter-dia de 4,9 a 13,1%. Os valores de LOD's e LOQ's, o volume de amostra requerida para a análise e o tempo necessário do preparo de amostra foram menores que a maioria dos métodos reportados na literatura para a análise de praguicidas em fluídos biológicos.

De maneira geral, o método desenvolvido pode ser utilizado na identificação e quantificação de diferentes substâncias utilizadas como praguicidas em amostras de urina humana suspeitas de envenenamento por esse tipo de compostos como uma alternativa para superar as dificuldades na rotina de laboratórios que executam análises toxicológicas forenses no esclarecimento das causas de mortes por intoxicações.

7 PERSPECTIVAS

A presente metodologia pode ser aplicada a outras amostras biológicas tais como sangue, plasma sanguíneo e conteúdo gástrico a fim de aumentar o leque de possibilidades de diferentes análises para a determinação de praguicidas em casos de envenenamento em análises toxicológicas forenses. Além disso, a técnica de extração utilizada nesse trabalho possui possibilidade de ser automatizada, o que pode aumentar ainda mais a frequência analítica. E para finalizar, a metodologia proposta ainda pode ser utilizada em análises de saúde ocupacional para o monitoramento de exposição a praguicidas.

REFERÊNCIAS

ANDERSSON, Maria et al. Simultaneous quantification of 11 cannabinoids and metabolites in human urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry using WAX-S tips. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 23, p. 6461-6471, jul. 2016.

ARTHUR, Catherine L.; PAWLISZYN, Janusz. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145-2148, out. 1990.

ASENSIO-RAMOS, María et al. Liquid phase microextraction applications in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 42, p. 7415-7437, out. 2011.

BALTUSSEN, Erik et al. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 11, n. 10, p. 737-747, 1999.

BEDENDO, Gizelle Cristina; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes; CARASEK, Eduardo. Multiresidue determination of pesticides in industrial and fresh orange juice by hollow fiber microporous membrane liquid-liquid extraction and detection by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 88, p. 573-580, jan. 2012.

BERTOLETE, J. M. et al. Deaths from pesticide poisoning: a global response. **British Journal of Psychiatry**, v. 189, n. 03, p. 201-203, set. 2006.

BIDARI, Araz et al. Sample preparation method for the analysis of some organophosphorus pesticides residues in tomato by ultrasound-assisted solvent extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1840-1844, jun. 2011.

BORDIN, Dayanne C. Mozaner et al. A Rapid Assay for the Simultaneous Determination of Nicotine, Cocaine and Metabolites in Meconium Using Disposable Pipette Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). **Journal of Analytical Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 31-38, nov. 2013.

BORDIN, Dayanne Cristiane Mozaner et al. Disposable pipette tips extraction: Fundamentals, applications and state of the art. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 6, p. 1168-1172, fev. 2016.

BOYACI, Ezel et al. Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases. **Analytica Chimica Acta**, v. 873, p. 14-30, mai. 2015.

BREWER, W. Pipette tips for extraction, sample collection and sample cleanup and methods for their use. **Google Patents**, 2014.

CARASEK, Eduardo; MERIB, Josias. Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 880, p. 8-25, jun. 2015.

CAZORLA-REYES, Rocío et al. Single solid phase extraction method for the simultaneous analysis of polar and non-polar pesticides in urine samples by gas chromatography and ultra high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 183-196, jul. 2011.

CHAVES, Andréa R. et al. The development of a new disposable pipette extraction phase based on polyaniline composites for the determination of levels of antidepressants in plasma samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1399, p. 1-7, jun. 2015.

CIATox/SC. **Distribuição das intoxicações registradas no CIATox/SC, por macrorregião de saúde**. Disponível em: <<http://citnovo.hu.ufsc.br/distribuicao-das-intoxicacoes-registradas-no-citsc/>>. Acesso em: 19 jan. 2018.

CIATox/SC. **Relatório Anual 2015**. Centro de Informação e Assistência Toxicológica de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

CORAZZA, Gabriela et al. A hybrid material as a sorbent phase for the disposable pipette extraction technique enhances efficiency in the determination of phenolic endocrine-disrupting compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 1513, p. 42-50, set. 2017.

ELLISON, S. T.; BREWER, W. E.; MORGAN, S. L.. Comprehensive Analysis of Drugs of Abuse in Urine Using Disposable Pipette Extraction. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 356-365, 1 set. 2009.

FUMES, Bruno Henrique et al. Recent advances and future trends in new materials for sample preparation. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 9-25, set. 2015.

GUAN, Hongxia et al. Disposable pipette extraction for the analysis of pesticides in fruit and vegetables using gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 12, p. 1867-1874, mar. 2010.

GUAN, Hongxia; BREWER, William E.; MORGAN, Stephen L.. New Approach to Multiresidue Pesticide Determination in Foods with High Fat Content Using Disposable Pipette Extraction (DPX) and Gas Chromatography–Mass spectrometry (GC-MS). **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v. 57, n. 22, p. 10531-10538, nov. 2009.

GUAN, Hongxia; STEWART, Katelyn. Determination of Explosives in Water Using Disposable Pipette Extraction and High Performance Liquid Chromatography. **Analytical Letters**, v. 47, n. 8, p. 1434-1447, mai. 2014.

HASEGAWA, Chika et al. Determination of dextromethorphan in human plasma using pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 7, p. 2215-2223, ago. 2011.

HASEGAWA, Chika et al. Pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography – mass spectrometry for the determination of methamphetamine and amphetamine in human whole blood. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 2, p. 563-570, jul. 2007.

JAIN, Rajeev; SINGH, Ritu. Microextraction techniques for analysis of cannabinoids. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 156-166, jun. 2016.

JIA, G. et al. Applicability of cloud point extraction coupled with microwave-assisted back-extraction to the determination of organophosphorous pesticides in human urine by gas chromatography with flame photometry detection. **Journal of Hazardous Materials**, v. 159, n. 1-3, p. 300-305, novembro 2008.

KIR, M. Ziya et al. Pesticide poisoning cases in Ankara and nearby cities in Turkey: An 11-year retrospective analysis. **Journal of Forensic And Legal Medicine**, v. 20, n. 4, p. 274-277, maio 2013.

KLAASSEN, Curtis D.; III, John B. Watkins (Org.). **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull**. 2ª edição, Porto Alegre: Amgh Editora Ltda, 2012. 470 p.

KOLE, Prashant Laxman et al. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. **Biomedical Chromatography**, v. 25, n. 1-2, p. 199-217, dez. 2010.

KONATU, Fernanda Ribeiro Begnini; BREITKREITZ, Márcia Cristina; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. Revisiting quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe parameters for sample preparation in pesticide residue analysis of lettuce by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1482, p. 11-22, jan. 2017.

LARINI, Lourival. **Toxicologia dos praguicidas**. São Paulo: Manole Ltda, 1999. 229 p.

LEHOTAY, Steven J. et al. Rapid analysis of aminoglycoside antibiotics in bovine tissues using disposable pipette extraction and ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1313, p. 103-112, out. 2013.

LEVINE, B. **Principles of Forensic Toxicology**. 2ª edição, New York: AACC Press, 2005. 800 p.

LÓPEZ, F.J et al. Gas chromatographic determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in human fluids using solid phase

microextraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 433, n. 2, p. 217-226, abr. 2001.

LUZARDO, Octavio P. et al. Validated analytical methodology for the simultaneous determination of a wide range of pesticides in human blood using GC–MS/MS and LC–ESI/MS/MS and its application in two poisoning cases. **Science & Justice**, v. 55, n. 5, p. 307-315, set. 2015.

MAJORS, R.E. New Designs and Formats in Solid-Phase Extraction Sample Preparation. **LC*GC Europe**. Dezembro de 2001.

MOREAU, R.L.M., SIQUEIRA, M.E.P.B. **Toxicologia Analítica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 318 p.

NETO, B.B; ESCARMINIO, I.S; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na pesquisa**. 4ª Edição, Editora: Bookman, 2010. 414 p.

NOGUEIRA, J. M. F. Microextração adsorptiva em barra (BA μ E): Um conceito analítico inovador para microextração estática. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 4, p. 275-283, 2013.

OGA, Seizi. **Fundamentos de toxicologia**. 4ª edição, São Paulo: Atheneu, 2014. 685 p.

PARK, Mee-jung et al. Postmortem blood concentrations of organophosphorus pesticides. **Forensic Science International**, v. 184, n. 1-3, p. 28-31, jan. 2009.

PASSAGLI, M. **Toxicologia Forense: Teoria e prática**. 2ª edição, Campinas: Millenium, 2009. 416 p.

PINTO, Mônia Ap. Lemos; SOUZA, Israel D. de; QUEIROZ, Maria Eugênia C. Determination of drugs in plasma samples by disposable pipette extraction with C18-BSA phase and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 139, p. 116-124, maio 2017.

PINTO, Mônia Aparecida Lemos; QUEIROZ, Maria Eugênia Costa. Extração em ponteiros descartáveis: fundamentos teóricos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 2, p. 101-108, 2015.

PPDB. **Pesticide Properties DataBase**. Universidade de Hertfordshire. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/atoz.htm>>. Acesso em 10 jan. 2018.

PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 9, p. 565-574, out. 2003.

QUEIROZ, Sonia C. N.; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C. S. F.. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, fev. 2001.

RIBANI, Marcelo et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, out. 2004.

ROCHA, Diogo L. et al. Greening sample preparation in inorganic analysis. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, v. 45, p. 79-92, abr. 2013.

RODRIGUES, Sherol Acosta; CALDAS, Sergiane Souza; PRIMEL, Ednei Gilberto. A simple; efficient and environmentally friendly method for the extraction of pesticides from onion by matrix solid-phase dispersion with liquid chromatography–tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 678, n. 1, p. 82-89, set. 2010.

SAITO, Yoshihiro; JINNO, Kiyokatsu. Miniaturized sample preparation combined with liquid phase separations. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1-2, p. 53-67, jun. 2003.

SANCO/12571/2013. **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General. Bélgica, 2013. 44 p.

SIGMA-ALDRICH. **Styrene-DVB Copolymer**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/13390?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 23 jan. 2018.

SIGMA-ALDRICH. **Supelclean™ ENVI and Supelclean™ SPE Cartridges**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=9645027>>. Acesso em: 19 jan. 2018.

SMITH, Roger M. Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1-2, p. 3-27, jun. 2003.

SOFT/AAFS. **Forensic Laboratory Guidelines**. 24 p. 2006.

STACEY, N.; WINTER, C. **Occupational toxicology**. 2ª edição, Florida: CRC Press, 2004. 624 p.

TEÓFILO, Reinaldo F.; FERREIRA, Márcia M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, abr. 2006.

TOXNET. **Toxicology Data Network**. Disponível em: <<https://toxnet.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 17 jan. 2018.

VALENTE, Nuno Ilídio Pereira. **Análise de Pesticidas Organofosforados em Toxicologia Forense**. 2012. 122 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

VALENTE, Nuno I.p. et al. Analysis of organophosphorus pesticides in whole blood by GC-MS- μ ECD with forensic purposes. **Journal of Forensic And Legal Medicine**, v. 33, p. 28-34, jul. 2015.

WHO. **Suicide**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs398/en/>>. Acesso em: 03 mar. 2018.

YAYCI, N. *et al.* Acute pesticide poisoning related deaths in Turkey. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 46, n. 6, p. 342-344, 2004.

ZHAO, Limian; ZHU, Lingyan; LEE, Hian Kee. Analysis of aromatic amines in water samples by liquid–liquid–liquid microextraction with hollow fibers and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 963, n. 1-2, p. 239-248, jul. 2002.

ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS NO MESTRADO

OENNING, A. L., MORÉS, L., DIAS, A. N., CARASEK, E. A new configuration for bar adsorptive microextraction (BA μ E) for the quantification of biomarkers (hexanal and heptanal) in human urine by HPLC providing an alternative for early lung cancer diagnosis. **Analytica Chimica Acta**, v. 965, 54-62, 2017.

OENNING, A. L., LOPES, D., DIAS, A. N., MERIB, J., CARASEK, E. Evaluation of two membrane-based microextraction techniques for the determination of endocrine disruptors in aqueous samples by HPLC with diode array detection. **Journal of Separation Science**, v. 40, 4431-4438, 2017.

MAFRA, G., OENNING, A. L., DIAS, A. N., MERIB, J., BUDZIAK, D., DA SILVEIRA, C. B., CARASEK, E. Low-cost approach to increase the analysis throughput of bar adsorptive microextraction (BA μ E) combined with environmentally-friendly renewable sorbent phase of recycled diatomaceous earth. **Talanta**, v. 178, 886-893, 2018.