

**Título:**

Método de microextração em baixa temperatura, em etapa única, para determinação de resíduos de agrotóxicos em soro sanguíneo

**Autores:**

SILVA, T. L. R. (thais.lindenberg@ufv.br; Universidade Federal de Viçosa); QUEIROZ, M. E. L. R. de (meliana@ufv.br; Universidade Federal de Viçosa); NEVES, A. A. (aneves@ufv.br; Universidade Federal de Viçosa); OLIVEIRA, A. F. de (andref.oliveira@ufv.br; Universidade Federal de Viçosa); VIEIRA, B. C. (breno.vieira@ifsudestemg.edu.br; Instituto Federal Sudeste de Minas - Barbacena); VIEIRA, P. A. F. (patricia.fontes@ufjf.edu.br; Universidade Federal de Juiz de Fora); OLIVEIRA, M. G. D. A. (malmeida@ufv.br; Universidade Federal de Viçosa).

**Resumo**

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método para determinar resíduos de agrotóxicos em soro sanguíneo por cromatografia gasosa. O método de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL/PBT) e análise por cromatografia gasosa (CG/DCE) foi otimizado utilizando-se de um planejamento fatorial completo  $2^3$  com ponto central ( $n=2$ ) e validado. Os fatores otimizados para 500  $\mu\text{L}$  de soro sanguíneo foram o volume de água adicionado, o volume de solvente extrator e o tempo de agitação. O método foi validado para as principais figuras de mérito apresentando resultados satisfatórios como por exemplo: LQ entre 8 e 17  $\mu\text{g L}^{-1}$  e % de recuperação entre 94 e 110% para os agrotóxicos clorpirifós, bifentrina,  $\lambda$ -cialotrina e deltametrina.

**Palavras-chave:**

Microtécnica; partição em baixa temp.; cromatografia gasosa

**Introdução:**

A contaminação humana ocorre em diferentes níveis, mas os trabalhadores rurais são os mais vulneráveis à intoxicação, pois possuem um contato direto com agrotóxicos (LONDRES *et al*, 2011). O contato com os agrotóxicos pode causar graves problemas à saúde humana, pois eles atuam em processos vitais e podem ter ação venenosa sobre o organismo humano. Os

agrotóxicos podem causar efeitos agudos (convulsões e morte) e crônicos (infertilidade e câncer) (PERES *et al*, 2003 e LONDRES *et al*, n2011).

Cientes desta problemática, estudos estão sendo desenvolvidos com o intuito de determinar substâncias exógenas - como drogas e agrotóxicos, em tecidos e fluídos biológicos (BRODIN *et al*, 2015). As amostras mais utilizadas para determinar resíduos de agrotóxicos em humanos são o sangue e a urina (QUEIROZ *et al*, 2001). O sangue fornece uma boa correlação entre a concentração do analito e seus efeitos clínicos. No entanto, possui uma curta janela de análise, a amostragem é invasiva e a amostra coletada é pequena. (BRODIN *et al*, 2015). Sendo assim, é importante desenvolver métodos de preparo de amostra que utilizem pequena quantidade da matriz para determinar de forma segura a presença dos compostos de interesse. Estes métodos devem remover substâncias que interfiram no sinal do analito ou que não sejam compatíveis com a técnica de análise, como por exemplo, proteínas, que não são compatíveis com as colunas de cromatografia gasosa (QUEIROZ *et al*, 2001). Uma técnica que vem apresentando resultados satisfatórios para diversas matrizes, inclusive matrizes biológicas, é a ELL/PBT. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um método para determinar resíduos de agrotóxicos de soro sanguíneo mesmo em pequenas quantidades.

### **Material e Métodos:**

O método extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura e análise por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (ELL/PBT-CG/DCE) otimizado, consistiu em adicionar a 500  $\mu\text{L}$  de amostras de soro fetal bovino, fortificadas com 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  de clorpirifós (CLOR), bifentrina (BIF) e  $\lambda$ -cialotrina ( $\lambda$ -CIA) e 17,7  $\mu\text{g L}^{-1}$  de deltametrina (DELT), 1000  $\mu\text{L}$  de água e 500  $\mu\text{L}$  de acetonitrila (ACN). Posteriormente a mistura foi agitada em vórtex por 1 min à temperatura ambiente e resfriada em freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por aproximadamente 12 h. Após a separação das fases pelo congelamento da fase aquosa (soro + água + proteínas) aproximadamente 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram recolhidos e analisados por CG/DCE. Para otimização deste método, as variáveis volume de água (700 e 1000  $\mu\text{L}$ ), volume do solvente extrator (500 e 700  $\mu\text{L}$ ) e tempo de agitação (20 e 60 s) foram avaliadas empregando um planejamento fatorial completo  $2^3$  com ponto central ( $n=2$ ), envolvendo 10 ensaios. As concentrações obtidas nas análises cromatográficas foram utilizadas como respostas para gerar os gráficos de Pareto dos efeitos e interações. O fator de enriquecimento também foi utilizado para selecionar os fatores mais eficientes no processo de extração.

O método ELL/PBT-CG/DCE otimizado para determinação de resíduos de agrotóxicos em soro sanguíneo foi validado para as principais figuras de mérito

(ANVISA, 2003). Para a etapa de validação as amostras foram fortificadas com  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de clorpirifós, bifentrina e  $\lambda$ -cialotrina e  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de deltametrina. Foram avaliados os parâmetros seletividade, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, exatidão (ensaios de recuperação), precisão (repetitividade e precisão intermediária).

### Resultados e Discussão:

A concentração dos agrotóxicos no extrato de cada ensaio foi empregada para gerar os gráficos de Pareto dos efeitos e interações da adição de água (F1), do volume de solvente extrator (F2) e do tempo de agitação (F3), na extração dos agrotóxicos em soro sanguíneo (Figura 1).

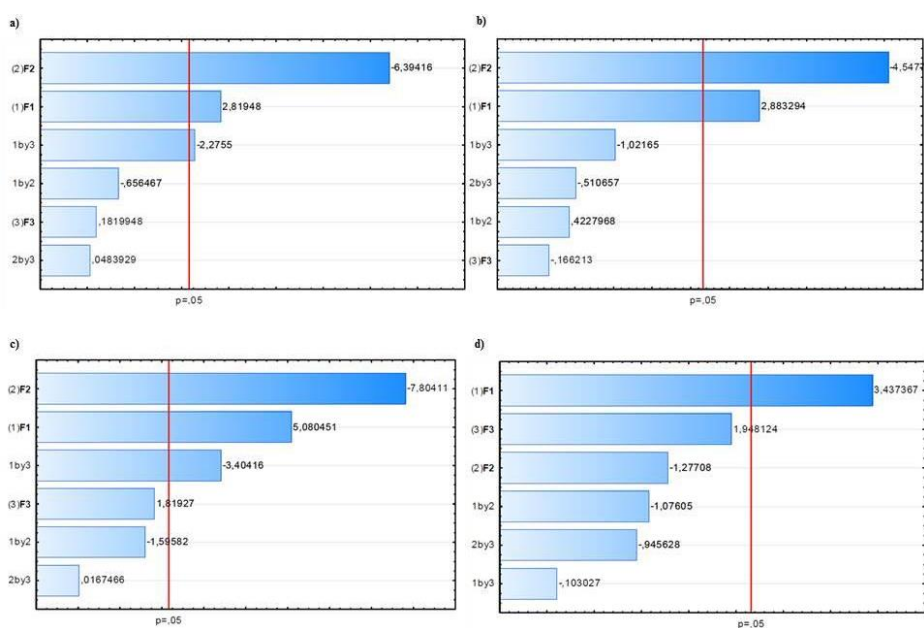


Figura 1. Gráfico de Pareto dos efeitos, sendo: (a) CLOR, (b) BIF, (c)  $\lambda$ -CIA e (d) DELT.

Nota-se que aumentar o volume de água e diminuir o volume de acetonitrila melhora a eficiência de extração de CLOR, BIF e  $\lambda$ -CIA. Provavelmente isso ocorre devido à interferência de proteínas, que tendem a precipitar quando o volume de solvente orgânico é maior do que o volume de água. As demais variáveis e interações não permitiram estabelecer a melhor condição para extrair simultaneamente os agrotóxicos. Em função disto o fator de enriquecimento (FE) foi empregado para selecionar o melhor ensaio. O melhor FE foi obtido para o ensaio em que maior volume de  $\text{H}_2\text{O}$  ( $1000 \mu\text{L}$ ), menor volume de ACN ( $500 \mu\text{L}$ ) e maior tempo de agitação ( $60 \text{ s}$ ) foram empregados (FE = 2,85 CLOR; 2,20 BIF; 3,33  $\lambda$ -CIA e 3,83 DELT).

O método otimizado foi validado avaliando-se a seletividade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária) (Tabela 1).

Tabela 1. Valores dos parâmetros de validação da microextração líquido-líquido com partição em baixa temperatura

Agrotóxico	R <sup>2</sup>	Faixa de Concentração / µg L <sup>-1</sup>	LQ / µg L <sup>-1</sup>	Repetitividade		Precisão Intermediária	
				CV	%R	CV	%R
Clorpirifós	0,990	20-100	8,58	8,97	98,8	11,0	94,4
Bifentrina	0,993	20-100	12,4	7,56	97,1	16,9	94,0
λ-cialotrina	0,990	20-100	17,0	7,92	101	14,5	110
Deltametrina	0,990	40-200	10,9	12,5	110	19,4	109

R<sup>2</sup>= coeficiente de determinação; LQ= limite de quantificação; % R= % de recuperação relativa à conc. de 50 µg L<sup>-1</sup> de CLOR, BIF e λ-CIA e 100 µg L<sup>-1</sup> de DELT; CV = coeficiente de variação.

As linearidades das curvas obtidas pelo método de superposição de matriz apresentaram R<sup>2</sup> > 0,98 na faixa de concentração estudada. Assim como sugerido pelos principais guias de validação a recuperações estão próximas a 100% e o CV < 20%.

### Conclusões:

A técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura foi otimizada e validada para a determinação de clorpirifós, bifentrina, λ-cialotrina e deltametrina em soro fetal bovino por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG/DCE). O método pode ser considerado viável para análise dos analitos em amostras de soro sanguíneo, por ser simples e eficaz, e, com baixo consumo de solvente. Além disso, a extração e *clean up* ocorrem em uma etapa única.

### Agradecimentos:

Os autores agradecem à FAPEMIG, ao CNPq, à UFV e à CAPES pelo apoio financeiro concedido.

## **Referências:**

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

BORDIN, D. C. M.; MONEDEIRO, F. F. da S. S; CAMPOS, E. G. de; ALVES, M. N. R.; BUENO, L. H. P. & MARTINIS, B. S. de. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatographica**, nº 7, 125-143, 2015.

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

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

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H. & JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova** , nº 24, 68-76, 2001.