

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA SCHMEISKE DA GRAÇA

AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA  
COM FIBRA OCA NA DETERMINAÇÃO DE PRAGUICIDAS EM AMOSTRAS  
DE SANGUE TOTAL PARA FINS FORENSES.

CURITIBA

2022

CAROLINA SCHMEISKE DA GRAÇA

AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA  
COM FIBRA OCA NA DETERMINAÇÃO DE PRAGUICIDAS EM AMOSTRAS  
DE SANGUE TOTAL PARA FINS FORENSES.

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do título de Mestre em Química ao  
Programa de Pós-graduação em Química, Setor  
de Ciências Exatas, Universidade Federal do  
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da  
Silva

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Graça, Carolina Schmeiske da

Avaliação de técnicas de microextração em fase líquida com fibra oca na determinação de praguicidas em amostras de sangue total para fins forenses. / Carolina Schmeiske da Graça. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva.

1. Sangue (*Postmortem*). 2. Sangue (microextração). 3. Toxicologia forense. I. Silva, Bruno José Gonçalves da. II. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **CAROLINA SCHMEISKE DA GRAÇA** intitulada: **AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA COM FIBRA OCA NA DETERMINAÇÃO DE PRAGUICIDAS EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL PARA FINS FORENSES**, sob orientação do Prof. Dr. BRUNO JOSÉ GONÇALVES DA SILVA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Novembro de 2022.

Assinatura Eletrônica

30/11/2022 12:24:53.0

**BRUNO JOSÉ GONÇALVES DA SILVA**

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

30/11/2022 13:53:16.0

**FREDERICO LUIS FELIPE SOARES**

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

30/11/2022 12:42:29.0

**EDUARDO GERALDO DE CAMPOS**

Avaliador Externo (APPALACHIAN STATE UNIVERSITY)

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva por ter sido inspiração na decisão de entrar no programa, por ter aceitado embarcar nesse projeto em parceria com a Polícia Científica do Paraná e por todo o apoio e aprendizado durante o percurso.

À Polícia Científica do Paraná e à Academia de Ciências Forenses por autorizar a realização do projeto e utilização das amostras.

Ao Prof. Dr. Frederico Luis Felipe Soares por todas as contribuições ao longo do trabalho, desde o parecer do projeto, além da orientação nos planejamentos experimentais.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Clarice Dias Britto do Amaral pela participação na banca de qualificação e contribuição ao trabalho.

Às colegas do CROME, Letícia que me ensinou o procedimento de extração, Rayta e Beatriz, parceiras nas análises por GC/MS e com quem aprendi tanto, e Andressa que passou por todas as etapas junto comigo e foi sempre alguém disponível pra conversar e dar apoio.

À Dayse, que além de colega do CROME é colega de trabalho, foi colega de faculdade e é amiga pra vida. Ninguém entende mais as dificuldades que eu tive no caminho e assim compreende o valor de cada vitória. Muito obrigada por todo o apoio nessa trajetória e saiba que sempre estarei ao seu lado na sua.

Ao meu marido André, parceiro que escolhi pra vida e maior incentivador desde o momento em que decidi voltar a estudar. Obrigada por ter sido o meu porto seguro nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Helia e Mario Carlos, por terem sempre apoiado os meus estudos, possibilitando a chegada até aqui.

Aos colegas da Polícia Científica do Paraná que dividiram o laboratório comigo todo esse tempo, me apoiaram e ajudaram com amostras.

Ao Programa de Pós Graduação em Química e à UFPR, dos quais tenho muito orgulho de ser aluna.

Aos órgãos de fomento CNPq e CAPES que possibilitam o desenvolvimento da ciência.

## RESUMO

Dentro da Toxicologia Forense, o preparo de amostra é etapa crucial no desenvolvimento de um método, visando a concentração dos analitos de interesse e eliminação de interferentes presentes nas amostras. Dentre as técnicas de preparo de amostra, as técnicas de microextração vêm gerando crescente interesse devido às suas vantagens, destacadamente o reduzido uso de solventes, em consonância com a química verde. Neste trabalho, foram avaliadas duas técnicas de microextração em fase líquida utilizando fibra oca, a microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME) e a microextração em fibra oca (HF $\mu$ E) na extração de praguicidas em amostras de sangue total *postmortem*. As duas técnicas foram avaliadas inicialmente por cromatografia em fase líquida com detector de arranjo de diodos (LC-DAD) e comparadas à técnica de extração líquido-líquido (LLE) utilizada atualmente pelo Laboratório de Toxicologia Forense da Polícia Científica do Paraná. Dentre as técnicas de microextração, a HF $\mu$ E mostrou-se capaz de extrair um maior número de analitos além de apresentar maior facilidade de execução. Assim, esta técnica foi selecionada para desenvolvimento de um método por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) para a determinação dos compostos clorpirifós, clorpirifós metil, diazinon, dissulfotom, terbufós alacloro, ametrina e atrazina em sangue total. O procedimento de extração utiliza 500 $\mu$ L de sangue total e 7,5 mL de solução tampão para compor a fase doadora, e fibras de polipropileno de 1 cm impregnadas com 1-octanol como solvente extrator. O sistema é mantido sob agitação magnética. Após otimização, foi definido o uso de solução tampão fosfato pH 6 para composição da fase doadora, agitação a 600 rpm e tempo de extração de 40 minutos. Todos os analitos apresentaram linearidade na faixa de trabalho de 50 ng mL<sup>-1</sup> a 800 ng mL<sup>-1</sup>, com valores de coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) variando entre 0,971 (dissulfotom) e 0,997 (diazinon). O método foi ainda aplicado a uma amostra real da Polícia Científica do Paraná, demonstrando sua capacidade de aplicação em uma rotina forense.

**Palavras chave:** microextração, praguicidas, sangue *postmortem*

## ABSTRACT

In Forensic Toxicology, sample preparation is a crucial step in method development, aiming at the concentration of the analytes of interest and elimination of interferences present in the samples. Among the sample preparation techniques, microextraction techniques have been generating increasing interest due to their advantages, notably the reduced use of solvents, aligned with the principles of green chemistry. In this work, two techniques of liquid phase microextraction using hollow fiber were evaluated, the hollow fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME) and the hollow fiber microextraction (HF $\mu$ E) in the extraction of pesticides in *postmortem* whole blood samples. The two techniques were initially evaluated by liquid chromatography with diode array detector (LC-DAD) and compared to the liquid-liquid extraction (LLE) technique currently used by the Forensic Toxicology Laboratory of the Scientific Police of Paraná. Among the microextraction techniques, HF $\mu$ E was able to extract a greater number of analytes, in addition to being easier to perform. Thus, this technique was selected to develop a method by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) for the determination of chlorpyrifos, chlorpyrifos methyl, diazinon, disulfotom, terbuphos alachlor, ametrine and atrazine in whole blood. The extraction procedure uses 500 $\mu$ L of whole blood and 7.5 mL of buffer solution to compose the donor phase, and 1 cm polypropylene fibers impregnated with 1-octanol as extracting solvent. The system is kept under magnetic stirring. After optimization, the use of pH 6 phosphate buffer solution was defined for the composition of the donor phase, agitation at 600 rpm and extraction time of 40 minutes. All analytes showed linearity in the working range of 50 ng mL<sup>-1</sup> to 800 ng mL<sup>-1</sup>, with coefficient of determination ( $R^2$ ) values ranging between 0.971 (disulfotom) and 0.997 (diazinon). The method was also applied to a real sample of the Scientific Police of Paraná, demonstrating its ability to be applied in a forensic routine.

**Keywords:** microextraction, pesticides, *postmortem* blood

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>FIGURA 1:</b> Esquema da HF-LPME em “U” (a), haste (b) e SBME (c).....  | 17 |
| <b>FIGURA 2:</b> Esquema dos sistemas em 2 (a) e 3 fases (b).....  | 18 |
| <b>FIGURA 3:</b> Fibra oca.....  | 20 |
| <b>FIGURA 4:</b> Micrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da fibra oca de polipropileno com aumento de 55 vezes (a) e de 350 vezes (b)..... | 21 |
| <b>FIGURA 5:</b> Estrutura básica dos carbamatos (a) e organofosforados (b).....   | 25 |
| <b>FIGURA 6:</b> Fluxograma da extração líquido-líquido.....   | 32 |
| <b>FIGURA 7:</b> Sistema de extração por HF-LPME em “U”.....   | 33 |
| <b>FIGURA 8:</b> Microextração com fibra oca (HF $\mu$ E).....   | 34 |
| <b>FIGURA 9:</b> Cromatograma obtido em 220 nm após extração líquido-líquido e eluição com fase móvel A (37:63 v/v (ACN:tampão)).....                        | 38 |
| <b>FIGURA 10:</b> Cromatogramas com adição de padrão após a extração (a) e antes da extração (b).....  | 39 |
| <b>FIGURA 11:</b> Comparação dos espectros dos analitos bentazona (a), carbaril (b), 2,4-D (c) e atrazina (d) com a biblioteca.....                          | 40 |
| <b>FIGURA 12:</b> Cromatograma obtido em 220 nm após extração líquido-líquido e eluição com fase móvel B (63:37 v/v (ACN:tampão)).....                       | 41 |
| <b>FIGURA 13:</b> Reações de dissociação dos compostos 2,4-D (a), picloram (b) e bentazona (c).....  | 44 |
| <b>FIGURA 14:</b> Gráfico de comparação das áreas de pico resultantes da dessorção com acetonitrila e metanol para a HF $\mu$ E.....                         | 46 |
| <b>FIGURA 15:</b> Reações de dissociação dos compostos difenacum (a) e brodifacum (b).....   | 49 |
| <b>FIGURA 16:</b> Brodifacum e difenacum nos pHs 3 e 7.....  | 50 |
| <b>FIGURA 17:</b> Comparação dos espectros dos analitos terbufós (a), oxifluorfem (b) e aletrina (c) com a biblioteca.....                                   | 51 |
| <b>FIGURA 18:</b> Compostos selecionados para desenvolvimento de método por GC/MS.....   | 53 |
| <b>FIGURA 19:</b> Cromatograma obtido após análise por cromatografia em fase gasosa em modo <i>full scan</i> .....   | 53 |
| <b>FIGURA 20:</b> Reação de decomposição dos herbicidas fenilureia.....  | 54 |
| <b>FIGURA 21:</b> Comparação do espectro do produto de degradação do diurom com a biblioteca.....  | 54 |

|  |    |
|--|----|
| <b>FIGURA 22:</b> Comparação do espectro do produto de degradação do clorimurum etil com a biblioteca.....                     | 55 |
| <b>FIGURA 23:</b> Compostos avaliados como padrão interno.....   | 56 |
| <b>FIGURA 24:</b> Cromatogramas dos analitos e candidatos a padrão interno.....  | 56 |
| <b>FIGURA 25:</b> Co-eluição entre os compostos terbufós e diazinon (b/c) e dissulfotom e etrinfós (d/e).....                  | 57 |
| <b>FIGURA 26:</b> Separação entre os compostos terbufós e diazinon, e dissulfotom e etrinfós através do método SIM.....        | 57 |
| <b>FIGURA 27:</b> Espectros de massa dos compostos terbufós e diazinon.....  | 58 |
| <b>FIGURA 28:</b> Gráfico da área dos compostos em função do solvente de dessorção.....  | 59 |
| <b>FIGURA 29:</b> Gráficos dos efeitos das variáveis tempo e modo de agitação na eficiência da dessorção.....                  | 61 |
| <b>FIGURA 30:</b> Gráfico dos efeitos pH, velocidade de agitação e adição de sal na eficiência da extração.....                | 65 |
| <b>FIGURA 31:</b> Superfície de resposta dos fatores velocidade de agitação e adição de sal.....                               | 66 |
| <b>FIGURA 32:</b> Gráfico da resposta em função do tempo de extração.....  | 67 |
| <b>FIGURA 33:</b> Gráfico da resposta em função do tempo de extração dos compostos atrazina, diazinon, alaclor e ametrina..... | 68 |
| <b>FIGURA 34:</b> Interferente de matriz no ensaio de seletividade.....  | 69 |
| <b>FIGURA 35:</b> Cromatogramas dos analitos e dos compostos do ensaio de seletividade.....                                    | 70 |
| <b>FIGURA 36:</b> Curvas analíticas e plotagem dos resíduos.....   | 70 |
| <b>FIGURA 37:</b> Cromatograma obtido de análise de amostra real.....  | 73 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>TABELA 1:</b> Notificações por agente tóxico registradas no SINAM NET (Dados de 2021 atualizados em 18/05/2022, sujeitos a revisão)..... | 13 |
| <b>TABELA 2:</b> Estudos empregando HF-LPME em sangue total.....  | 24 |
| <b>TABELA 3:</b> Analitos de acordo com sua ação e classe química, e suas propriedades físico-químicas.....                                 | 28 |
| <b>TABELA 4:</b> Condições cromatográficas.....   | 31 |
| <b>TABELA 5:</b> Níveis de concentração da curva analítica.....   | 36 |
| <b>TABELA 6:</b> Parâmetros cromatográficos dos analitos do Grupo A e eficiência da extração líquido líquido.....                           | 38 |
| <b>TABELA 7:</b> Parâmetros cromatográficos dos analitos do Grupo B e eficiência da extração líquido-líquido.....                           | 41 |
| <b>TABELA 8:</b> Comparação entre LLE, HF-LPME em 2 fases e HF $\mu$ E.....   | 43 |
| <b>TABELA 9:</b> Comparação entre HF-LPME em 3 fases e HF $\mu$ E.....  | 44 |
| <b>TABELA 10:</b> Solventes avaliados para uso em HF $\mu$ E e suas propriedades físico-químicas.....                                       | 47 |
| <b>TABELA 11:</b> Analitos extraídos por HF $\mu$ E de acordo com o pH.....   | 48 |
| <b>TABELA 12:</b> Parâmetros de identificação dos analitos.....   | 58 |
| <b>TABELA 13:</b> Planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> dos fatores modo de agitação e tempo.....  | 60 |
| <b>TABELA 14:</b> Níveis dos fatores avaliados.....   | 60 |
| <b>TABELA 15:</b> Níveis dos fatores pH, velocidade de agitação e sal.....  | 62 |
| <b>TABELA 16:</b> Matriz do planejamento Box-Behnken.....   | 63 |
| <b>TABELA 17:</b> Valores de desejabilidade.....  | 64 |
| <b>TABELA 18:</b> Equações da reta e coeficientes de determinação.....  | 72 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – Acetonitrila

ATS – Análise Toxicológica Sistemática

DAD – Detector de Arranjo de Diodos

DI-SDME – “*Direct Immersion Single Drop Microextraction*” – Microextração em Gota Suspensa por Imersão Direta

GC – “*Gas Chromatography*” – Cromatografia Gasosa

HF-LPME – “*Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction*” – Microextração em Fase Líquida Suportada com Fibra Oca

HF $\mu$ E – “*Hollow Fiber MicroExtraction*” – Microextração em Fibra Oca

HS-SDME – “*HeadSpace Single Drop Microextraction*” – Microextração em Gota Suspensa em HeadSpace

LC – “*Liquid Chromatography*” – Cromatografia Líquida

LC-DAD – “*Liquid Chromatography with Diode Array Detection*” – Cromatografia líquida com Detecção por Arranjo de Diodos

LLE – “*Liquid-Liquid Extraction*” – Extração Líquido-Líquido

MS – “*Mass Spectrometry*” – Espectrometria de Massas

SLM – “*Supported Liquid Membrane*” – Membrana Líquida Suportada

SBME – “*Solvent Bar Microextraction*” – Microextração em Barra Solvente

SDME – “*Single Drop Microextraction*” – Microextração em Gota Suspensa

Sinam – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

TLC – “*Thin Layer Chromatography*” – Cromatografia em Camada Delgada

UV – Ultravioleta

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>12</b> |
| 1.1 TOXICOLOGIA FORENSE .....  | 12        |
| 1.1.1 Análise Toxicológica Sistemática .....                                     | 14        |
| 1.2 MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA .....  | 16        |
| 1.2.1 Parâmetros de otimização das extrações com membrana líquida suportada..... | 19        |
| 1.2.2 Aplicações da microextração em fase líquida em Toxicologia Forense.....    | 22        |
| 1.3 PRAGUICIDAS.....   | 23        |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....   | <b>27</b> |
| 2.1 OBJETIVO GERAL .....   | 27        |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 27        |
| <b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | <b>28</b> |
| 3.1 PADRÕES ANALÍTICOS .....   | 28        |
| 3.2 REAGENTES .....  | 29        |
| 3.3 INSTRUMENTAÇÃO .....   | 30        |
| TABELA 4 – CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS .....                                       | 31        |
| 3.4 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO .....   | 31        |
| 3.4.1 Extração líquido-líquido.....  | 31        |
| 3.4.2 Técnicas de microextração com fibra oca.....                               | 32        |
| 3.5 AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL .....   | 35        |
| 3.6 OTIMIZAÇÃO DA MICROEXTRAÇÃO COM FIBRA OCA .....                              | 35        |
| 3.7 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MÉRITO .....                                     | 35        |
| 3.7.1 Seletividade .....   | 35        |
| 3.7.2 Lineariedade (Modelo de Calibração).....                                   | 36        |
| 3.7.3 <i>Carryover</i> .....   | 36        |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | <b>37</b> |
| 4.1 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E DA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO .....  | 37        |
| 4.2 SELEÇÃO DO SISTEMA DE EXTRAÇÃO .....   | 42        |
| 4.3 HF $\mu$ E.....  | 45        |
| 4.3.1 Seleção do solvente de dessorção para a HF $\mu$ E.....                    | 45        |
| 4.3.2 Avaliação de solventes orgânicos .....                                     | 47        |
| 4.3.3 Avaliação do pH da fase doadora.....                                       | 48        |
| 4.4 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO CONFIRMATÓRIO POR GC/MS.....                       | 52        |
| 4.4.1 Seleção dos compostos de interesse.....                                    | 52        |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.4.2 Seleção do padrão interno .....  | 55        |
| 4.4.3 Condições cromatográficas .....  | 56        |
| 4.4.4 Otimização do procedimento de microextração .....                            | 59        |
| 4.4.4.1 Dessorção .....  | 59        |
| 4.4.4.2 Otimização multivariada – pH, velocidade de agitação e adição de sal ..... | 62        |
| 4.4.4.3 Otimização do tempo de extração .....                                      | 67        |
| 4.4.5 Avaliação dos parâmetros de mérito .....                                     | 68        |
| 4.4.5.1 Seletividade .....   | 68        |
| 4.4.5.2 Linearidade .....  | 70        |
| 4.4.5.3 Carryover .....  | 72        |
| 4.4.6 Aplicação do método em amostra real .....                                    | 73        |
| <b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO .....</b>                                   | <b>74</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>76</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 TOXICOLOGIA FORENSE

A toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos que substâncias químicas como medicamentos, drogas de abuso, solventes, praguicidas, dentre outros, podem causar ao organismo. Quando aplicada em um contexto legal, ou seja, utilizada para elucidação de questões em procedimentos judiciais, entra-se no campo da toxicologia forense (CHASIN; LIMA, 2014; OLIVEIRA et al., 2018).

A toxicologia forense engloba diversas áreas. Dentre elas, a mais antiga é a toxicologia forense *post mortem*. Resultados de análises toxicológicas em investigações de mortes são utilizados para determinar se alguma substância química foi a causa da morte, se contribuiu de alguma maneira ou se causou alguma incapacitação ao indivíduo (SKOPP, 2010). Porém, muitas das substâncias que podem estar envolvidas não produzem lesões características no organismo, assim sua presença deve ser elucidada através de métodos químicos de separação e identificação. Neste contexto, a toxicologia forense é intimamente ligada à química analítica, já que aplica as suas técnicas para a determinação qualitativa e/ou quantitativa de substâncias tóxicas. Os analitos, nestes casos, são os xenobióticos (substâncias químicas estranhas ao organismo) ou seus produtos decorrentes de processos de biotransformação, enquanto as amostras utilizadas consistem em matrizes biológicas, como fluidos corporais ou tecidos, por exemplo (GOLDBERGER; WILKINS, 2013).

As substâncias químicas de interesse na Toxicologia Forense são várias, já que, como Paracelso disse, “Todas as substâncias são venenos; não existe uma que não seja veneno. A dose certa diferencia um veneno de um remédio”. Os venenos em Toxicologia Forense são geralmente classificados em diversas categorias baseadas no tipo de analito e nas técnicas analíticas: gases, álcool e voláteis, não voláteis (como medicamentos, alcaloides, drogas e praguicidas), metais e toxinas, sendo que a prevalência de cada classe varia entre os países (CHUNG; CHOE, 2018). No Brasil, dados do Sinam (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), ilustram a prevalência dos agentes tóxicos envolvidos em casos de intoxicação no país, conforme ilustrado na Tabela 1.

Diversas matrizes biológicas podem ser utilizadas nas análises toxicológicas *post mortem*. A urina, por exemplo, geralmente é selecionada para as análises de triagem, já que a excreção urinária concentra os analitos, tornando mais fácil sua detecção e por um período maior, além de ser uma matriz não invasiva frente a outras como sangue. Em compensação,

a matriz de escolha para quantificação é o sangue, visto que a concentração nesta matriz se relaciona diretamente aos efeitos tóxicos e farmacológicos (VINCENTI et al., 2013). Além do sangue e da urina, amostras comuns em análises toxicológicas em vivos, a necropsia permite a coleta de outras amostras como humor vítreo, conteúdo gástrico e tecidos, como fígado, rim e cérebro. Dependendo da condição do corpo, podem ser ainda utilizadas matrizes alternativas como cabelo, unhas e ossos (WYMAN, 2012).

TABELA 1 – NOTIFICAÇÕES POR AGENTE TÓXICO REGISTRADAS NO SINAM NET (DADOS DE 2021 ATUALIZADOS EM 18/05/2022, SUJEITOS A REVISÃO)

| <b>Agente Tóxico</b>     | <b>Notificações</b> |
|--------------------------|---------------------|
| Ignorado                 | 13999               |
| Medicamento              | 82199               |
| Agrotóxico agrícola      | 3816                |
| Agrotóxico doméstico     | 1598                |
| Agrotóxico saúde pública | 188                 |
| Raticida                 | 4261                |
| Prod. veterinário        | 1015                |
| Prod. uso domiciliar     | 7511                |
| Cosmético                | 1197                |
| Prod. químico            | 3418                |
| Metal                    | 242                 |
| Drogas de abuso          | 18077               |
| Planta tóxica            | 904                 |
| Alimento e bebida        | 6159                |
| Outro                    | 3448                |
| Total                    | 148032              |

FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE

As amostras *post-mortem* são, em geral, amostras mais complexas quando comparadas às amostras de indivíduos vivos. Por exemplo, enquanto análises em vivos geralmente são executadas em soro ou plasma, em cadáveres a amostra utilizada é o sangue total, já que a separação das células e do soro normalmente não é possível (SKOPP, 2010). O sangue total apresenta uma grande variedade de compostos endógenos (como ácidos graxos e colesterol) que, embora também presentes no soro e no plasma, nestes estão em quantidades muito menores (JONES, 2008). Neste sentido, o tratamento da amostra é a etapa mais crítica de uma análise toxicológica, visando a extração e pré-concentração do analito, além da eliminação ou diminuição de potenciais interferentes presentes na matriz. Portanto, pode-se afirmar que um preparo de amostra adequado corrobora para um aumento

de sensibilidade e seletividade de um método analítico (MANOUSHI; SAMANIDOU, 2021; PETERS et al., 2018).

Os procedimentos analíticos utilizados nas análises toxicológicas geralmente combinam métodos cromatográficos, empregados para separação dos compostos presentes na amostra, com métodos espectroscópicos e espectrométricos para detecção e identificação dos compostos de interesse. Dentre os métodos cromatográficos mais empregados, encontram-se a cromatografia em camada delgada (TLC – *thin layer chromatography*), cromatografia líquida (LC – *liquid chromatography*) e cromatografia gasosa (GC – *gas chromatography*). Já entre os espectroscópicos e espectrométricos, destacam-se os detectores por absorção molecular no ultravioleta, visível e infravermelho, bem como a espectrometria de massas (MS – *mass spectrometry*) (LINDEN; ANTUNES, 2018).

Porém, mesmo tendo em mãos metodologias empregando técnicas avançadas para os fins forenses, um dos maiores desafios da Toxicologia Forense é o fato de que, conforme discutido anteriormente, o espectro de substâncias de interesse toxicológico é bastante amplo. Assim, uma abordagem prática tem sido realizar uma análise direcionada de acordo com o histórico de cada caso (JONES, 2008). Porém, a falta de informações que possam direcionar o procedimento analítico é uma situação comum em um laboratório de Toxicologia Forense. Desta maneira, estes casos requerem uma abordagem concisa e planejada, denominada Análise Toxicológica Sistemática.

### 1.1.1 Análise Toxicológica Sistemática

A Análise Toxicológica Sistemática (ATS) é a busca por substâncias tóxicas em uma amostra biológica, sem qualquer informação sobre a presença e identidade da substância. É uma tarefa difícil devido ao amplo espectro de possíveis substâncias tóxicas e metabólitos, que podem ocorrer em concentrações muito baixas (da ordem de  $\text{ng mL}^{-1}$ ) e em matrizes complexas (BROECKER et al., 2011).

A sistematização nessa abordagem ocorre basicamente em três etapas: i) preparo da amostra, com isolamento e concentração das substâncias de interesse; ii) separação e detecção dos compostos; iii) identificação (DE ZEEUW, 1997). Sempre que possível, para a confirmação do resultado obtido da ATS, deve ser utilizado um método baseado em um princípio físico ou químico diferente do primeiro método utilizado para garantir a confiabilidade do resultado obtido e do laudo final (STIMPFL et al., 2011).

Neste sentido, o Laboratório de Toxicologia da Polícia Científica do Paraná atualmente aplica a técnica de análise toxicológica sistemática desenvolvida por Pragst e colaboradores (2004). Nesta técnica, a extração líquido-líquido (LLE – *liquid-liquid extraction*) é utilizada como método de preparo de amostra. Para separação dos compostos de interesse, tem sido empregada a cromatografia líquida utilizando coluna de octilsilano (RP-8) e dois tipos de fase móvel constituídas de acetonitrila (ACN) e tampão fosfato pH 2,3 em diferentes proporções. A primeira, a Fase A, possui uma maior proporção de tampão, 37:63 (ACN:tampão), enquanto a Fase B tem a proporção inversa, 63:37 (ACN:tampão). Devido à sua maior proporção de solvente orgânico, a Fase B é utilizada na análise de compostos mais apolares, que ficariam retidos por um tempo muito longo na coluna na corrida com Fase A.

A identificação dos compostos é realizada por detector de arranjo de diodos (DAD) através da comparação dos espectros de absorção obtidos em condições padronizadas com uma biblioteca de referência. Adicionalmente, a injeção de uma solução controle permite o cálculo de tempos de retenção relativo que também são comparados com a biblioteca.

Sistemas LC-DAD empregados em análises de triagem toxicológica por apresentarem vantagens como robustez, reprodutibilidade, e baixa interferência de substâncias endógenas como colesterol, ácidos graxos, lipídeos e carboidratos, que não possuem absorção significativa de radiação UV acima de 195 nm. Além disso, permitem a análise de compostos de baixa volatilidade e instáveis termicamente (PRAGST et al., 2007).

A LLE se baseia na extração dos analitos através do princípio de partição destes entre um solvente orgânico imiscível (fase extratora) com a fase aquosa (matriz biológica). Com a síntese de vários reagentes orgânicos seletivos e sensíveis, a LLE se tornou o método mais comum de preparo de amostra a partir de meados do século XX. Entretanto, apesar de ser uma técnica de extração eficaz, o interesse na LLE clássica começou a diminuir, principalmente devido à necessidade do uso de grandes quantidades de solventes orgânicos potencialmente tóxicos (CAMPILLO et al., 2019).

Com a introdução e popularização do conceito da química verde, muitos pesquisadores passaram a focar na miniaturização dos sistemas de extração, e novas técnicas de preparo de amostra baseadas neste conceito vêm sendo desenvolvidas nas últimas décadas. A principal característica da microextração é usar uma quantidade mínima ou nenhum solvente, o que a torna mais ambientalmente sustentável (CAMPILLO et al., 2019; HE; CONCEIRO-GUISAN, 2019). Além disso, é apropriada à necessidade de pequenos

volumes de amostras, sendo este fato especialmente interessante quando as análises são realizadas em matrizes biológicas.

## 1.2 MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA

A miniaturização da técnica tradicional de LLE levou ao desenvolvimento de novas técnicas em que houve uma grande redução na razão entre os volumes da fase doadora (amostra) e da fase aceptora (solvente extrator).

Dentre as técnicas de microextração em fase líquida, a primeira a ser desenvolvida foi a microextração em gota suspensa (SDME – *single drop microextraction*), em 1995 por Liu e Dasgupta (LIU; DASGUPTA, 1995). A SDME se baseia na extração de um analito da amostra (fase doadora) para uma única gota de solvente orgânico, seja pela imersão direta da gota na amostra aquosa (DI-SDME – *direct immersion single drop microextraction*) ou pela suspensão da gota em um headspace (HS-SDME – *headspace single drop microextraction*). Esta técnica, apesar de simples e eficaz, apresenta como grande desvantagem a instabilidade da gota (DMITRIENKO et al., 2021; KAILASA et al., 2021)

De forma a contornar este problema, Pedersen-Bjergaard e Rasmussem introduziram, em 1999, o uso da fibra oca como suporte para a microextração em fase líquida, criando a microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME – *hollow fiber liquid-phase microextraction*), uma variação de extração utilizando membrana líquida suportada (*supported liquid membrane - SLM*) (PEDERSEN-BJERGAARD S, 1999).

Dentre as técnicas de microextração em fase líquida, a HF-LPME está entre as mais utilizadas para extração de fluidos biológicos complexos. A razão para isso é que nestas técnicas a fibra protege a fase aceptora de vazamento para a matriz biológica (HANSEN; ØIESTAD; PEDERSEN-BJERGAARD, 2020), bem como inibe a entrada de macromoléculas presentes na matriz biológica para o lúmen (parte oca interna) da fibra, agindo como uma barreira física para estes interferentes.

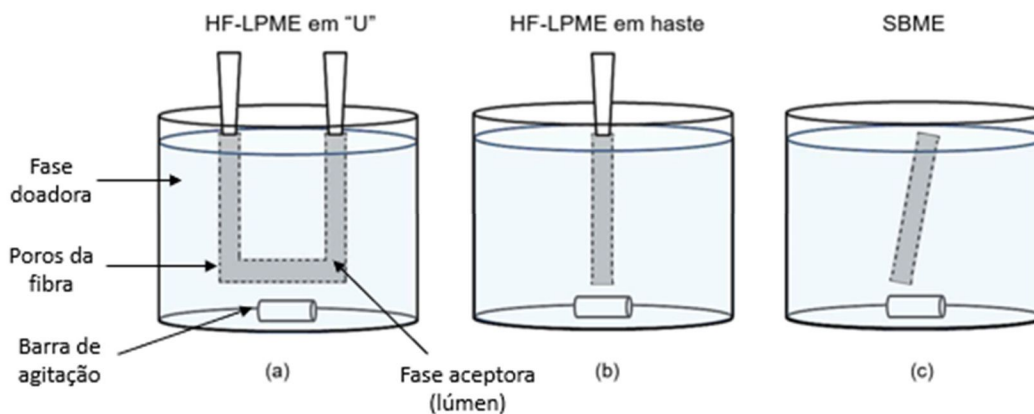
Nesta técnica, os poros de uma membrana capilar porosa e hidrofóbica são impregnados com o solvente orgânico de extração, imiscível com a fase aquosa, enquanto o seu lúmen é preenchido com uma fase aceptora. Esta fibra é então colocada em um vial contendo a amostra (fase doadora). O analito é extraído da amostra aquosa (fase doadora), através do solvente orgânico imobilizado nos poros da fibra, para o solvente presente no seu lúmen (fase aceptora) (ESRAFILI et al., 2018; SHARIFI; ABBASI; NOSRATI, 2016).

A HF-LPME apresenta diversas vantagens, dentre as quais o volume muito pequeno de solvente utilizado (10-20  $\mu\text{L}$ ); alta eficiência de limpeza da amostra já que a maioria dos componentes da matriz solúveis em água não atravessam a fibra, como sais, substâncias orgânicas polares e macromoléculas; alto fator de enriquecimento (normalmente entre 50 e 500 vezes) para analitos orgânicos e inorgânicos em uma ampla faixa de polaridade; além da capacidade de acoplamento online a sistemas cromatográficos (MANOUSHI; SAMANIDOU, 2021; PEDERSEN-BJERGAARD, 2019; SHARIFI; ABBASI; NOSRATI, 2016).

A extração por HF-LPME requer um suporte para sustentação da fibra durante a extração, que pode ser realizada na configuração em haste ou em “U”.

Na configuração em haste, uma das extremidades da fibra é selada com o uso de pinças ou pelo calor, enquanto a extremidade oposta é conectada a uma microseringa (Figura 1b). Já na configuração em “U”, ambas as extremidades são ligadas a microseringas (Figura 1a). Neste caso, a principal vantagem é que fibras mais longas são utilizadas, aumentando a superfície de contato entre a fibra e a fase doadora, propiciando maiores taxas de recuperação (DMITRIENKO et al., 2021; ESRAFILI et al., 2018).

FIGURA 1 – ESQUEMA DA HF-LPME EM “U” (a), HASTE (b) E SBME (c)



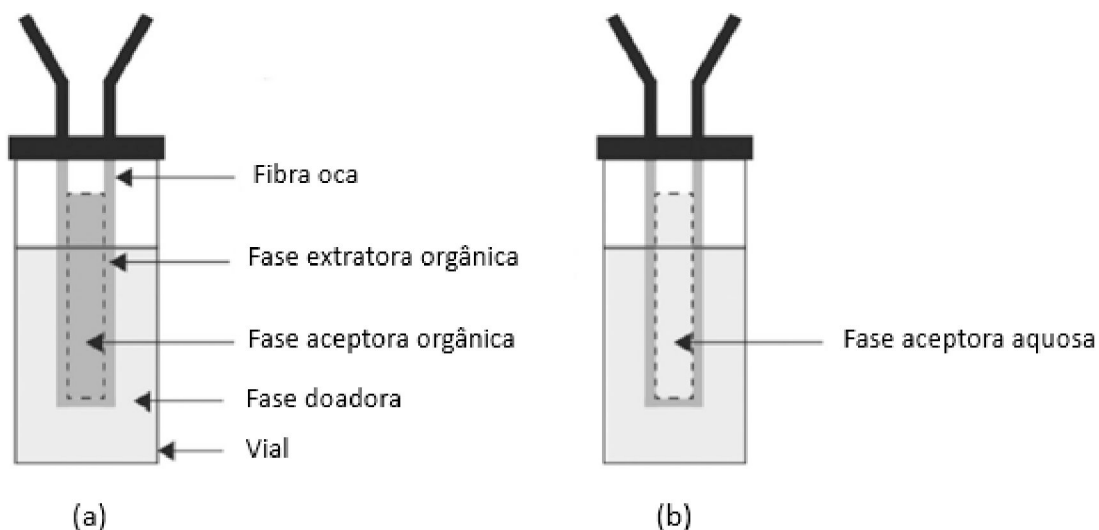
HF-LPME: microextração em fase líquida suportada com fibra oca; SBME: microextração em barra solvente  
 FONTE: adaptado de LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2019

Por outro lado, estes sistemas apresentam a desvantagem de limitar o número de amostras que podem ser processadas simultaneamente, prejudicando sua aplicação em uma rotina laboratorial (baixa frequência analítica). Além disso, o contato do solvente extrator com a amostra é limitado, já que a fibra permanece em uma posição fixa durante o processo (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2019).

Neste contexto, foi desenvolvida, em 2004, a microextração em barra solvente (SBME - *solvent bar micro-extraction*). Nesta técnica, a fibra contendo a fase aceptora é selada nas duas extremidades e imersa na fase doadora sob agitação (Figura 1c). Decorrido o tempo da extração, a fibra então é retirada, uma das suas extremidades é cortada e seu conteúdo é recolhido com uma seringa (JIANG; LEE, 2004). Como, na SBME, a fibra se move livremente na fase doadora, há um aumento na superfície de contato, acarretando um maior fator de enriquecimento e redução no tempo de extração (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2019; YAMINI; REZAZADEH; SEIDI, 2019).

Tanto a HF-LPME quanto a SBME podem ser utilizadas em dois modos: duas ou três fases, de acordo com a fase aceptora utilizada (Figura 2). No sistema em duas fases, a fase aceptora no lúmen é o mesmo solvente impregnado na fibra. Para utilização deste sistema, os analitos de interesse devem ter solubilidade significativamente maior no solvente orgânico em comparação com a fase aquosa (GHAMBARIAN; YAMINI; ESRAFILI, 2012; OLIVEIRA et al., 2008). (MADIKIZELA et al., 2020)

FIGURA 2 – ESQUEMA DOS SISTEMAS EM 2 (a) E 3 FASES (b)



FONTE: Adaptado de PEDERSEN-BJERGAARD, 2019

Já no sistema em três fases, a fase aceptora é aquosa. A fase orgânica atua como uma barreira entre as fases aceptora e doadora, impedindo o contato entre as duas fases aquosas. Enquanto o sistema em duas fases tem sido adequado para extração de substâncias hidrofóbicas, para o sistema em três fases é desejável que o analito contenha grupos funcionais ionizáveis de modo que sua extração para o lúmen da fibra oca possa ser

controlada pelo processo de protonação e desprotonação dos analitos (HE; CONCHEIRO-GUISAN, 2019; MANOUSHI; SAMANIDOU, 2021).

No sistema em duas fases, a fase aceptora orgânica é compatível com a cromatografia a gás sem necessidade de evaporação do solvente, enquanto a fase aquosa do sistema em três fases pode ser injetada diretamente no sistema de cromatografia a líquido. O volume da fase aceptora varia de 5 a 50  $\mu\text{L}$  (HANSEN; ØIESTAD; PEDERSEN-BJERGAARD, 2020).

Visando facilitar ainda mais o processo de extração, eliminando etapas manuais como o uso de microseringas para inserir e recuperar a fase aceptora do lúmen da fibra e o selamento da fibra, que dependem da habilidade do operador, Ide e Nogueira desenvolveram a microextração em fibra oca (HF $\mu\text{E}$ ) (IDE; NOGUEIRA, 2018). Na HF $\mu\text{E}$ , um segmento da fibra oca é impregnado com o solvente extrator e, então, imerso na fase doadora sob agitação, onde se move livremente, assim como na SBME. Ao fim do tempo de extração, segue-se uma etapa de dessorção em que a fibra é inserida em um vial com insert contendo o mesmo solvente utilizado para a extração e submetida a agitação em banho ultrassônico. Após esta etapa, o vial está pronto para injeção no sistema analítico (IDE; NOGUEIRA, 2018). Esta técnica permitiu, ainda, a utilização de mais de uma fibra (dual-HF $\mu\text{E}$ ), impregnada com um solvente diferente, ampliando assim a capacidade de extração de analitos em uma ampla faixa de polaridade (IDE; NOGUEIRA, 2019a). A técnica foi aplicada na determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e de praguicidas organoclorados em uma grande variedade de matrizes, incluindo água de superfície, água residual, solo, chá, fígado de peixe e tomate.

A utilização da fibra como suporte do solvente e posterior dessorção, em detrimento do recolhimento do solvente inserido no seu lúmen, abre possibilidades de automação, facilitando ainda mais o processo de extração. No trabalho de Pierri e colaboradores (PIERRI et al., 2022), foi realizada a determinação de disruptores endócrinos em urina, utilizando a fibra oca impregnada com solvente, de forma automatizada através do uso de uma placa de 96 poços.

### 1.2.1 Parâmetros de otimização das extrações com membrana líquida suportada

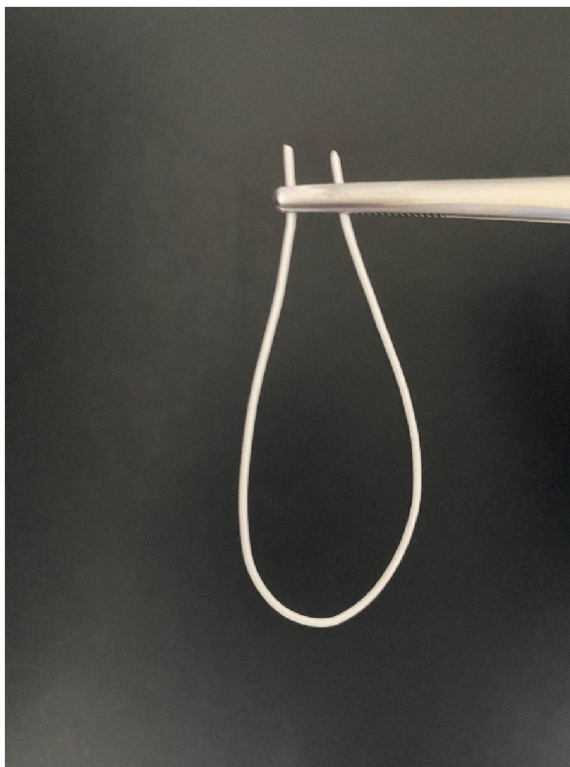
Diversos fatores podem ser ajustados com o objetivo de otimizar as extrações com membrana líquida suportada (SLM), tais como a HF-LPME, a SBME e a HF $\mu\text{E}$ , incluindo as características da membrana, a natureza do solvente utilizado, o pH, o tempo da extração, a temperatura, a agitação, os volumes das fases e a adição de sal na fase doadora

(ALSHARIF et al., 2017; DMITRIENKO et al., 2021; PEDERSEN-BJERGAARD, 2019; SHARIFI; ABBASI; NOSRATI, 2016).

As membranas utilizadas devem ser hidrofóbicas, compatíveis com o solvente orgânico, e altamente porosas (Figura 3). As mais comumente utilizadas são as de polipropileno (MERIB; CARASEK, 2013). O polipropileno é um excelente material devido à sua resistência a solventes orgânicos, flexibilidade e força mecânica. Quanto às dimensões, as mais utilizadas possuem diâmetro interno de 600  $\mu\text{m}$ , permitindo facilmente a inserção da microsseringa no lúmen; espessura de 200  $\mu\text{m}$  (curta distância de difusão, mas ainda estável mecanicamente), e tamanho dos poros de 0,2  $\mu\text{m}$  (Figura 4) (HAVLIKOVA et al., 2019). Com essas dimensões, 1 cm de fibra é capaz de imobilizar aproximadamente 8  $\mu\text{L}$  de solvente (DMITRIENKO et al., 2021).

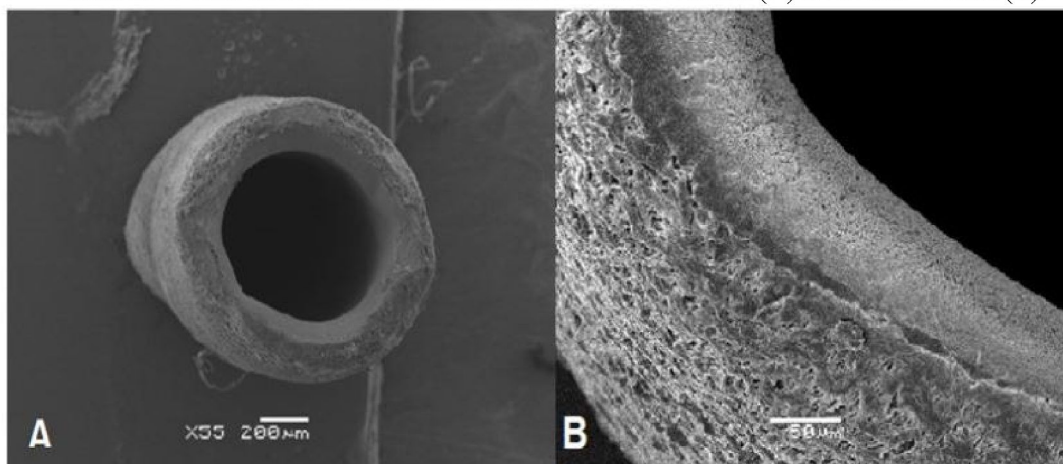
A escolha do solvente orgânico deve levar em conta algumas propriedades. O solvente deve ter baixa solubilidade em água (ou ser insolúvel) para evitar a dissolução na fase doadora, baixa volatilidade para evitar a perda de fase orgânica durante a extração, e polaridade compatível com o material da fibra para facilitar a impregnação nos poros (ALSHARIF et al., 2017; DMITRIENKO et al., 2021). Os solventes mais utilizados têm sido o 1-octanol, éter dihexílico, undecano e tolueno (HAVLIKOVA et al., 2019).

FIGURA 3 – FIBRA OCA



FONTE: A AUTORA

FIGURA 4 - MICROGRAFIAS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DA FIBRADA DE POLIPROPILENO COM AUMENTO DE 55 VEZES (A) E DE 350 VEZES (B).



FONTE: HORTA, 2017

O pH é um parâmetro muito importante que afeta a eficiência de extração, estando relacionado com os valores de pKa dos analitos. Genericamente, em qualquer sistema de extração com solventes utilizando duas fases, o pH da amostra é ajustado de forma a manter qualquer analito ácido ou básico em sua forma não ionizada, aumentando sua solubilidade no solvente orgânico. No sistema de HF-LPME ou SBME em três fases, o pH da fase doadora deve ser ajustado desta forma. Já o pH da fase aceptora deve ser ajustado a um valor em que os analitos se dissociem, aumentando sua solubilidade na fase aquosa aceptora, para que assim não migrem novamente para a fase doadora. A diferença de pH entre a fase doadora e a aceptora é um dos principais parâmetros que podem promover a transferência dos analitos da fase doadora para o solvente orgânico imobilizado e, posteriormente, para a fase aceptora (ALSHARIF et al., 2017; HE, 2014; PEDERSEN-BJERGAARD, 2019).

Assim como qualquer técnica de extração, o tempo é um parâmetro crucial e, idealmente, deve ser o mais curto possível. A extração é baseada em um processo de equilíbrio de partição, assim a recuperação aumenta com o tempo de extração até que o equilíbrio seja atingido. Durante a otimização do método, é importante estabelecer experimentalmente este tempo através de curvas recuperação x tempo (PEDERSEN-BJERGAARD, 2019; SHARIFI; ABBASI; NOSRATI, 2016).

A temperatura e agitação do sistema podem diminuir o tempo necessário para que se atinja o equilíbrio. A temperatura pode, quando aumentada, diminuir o tempo da extração através do aumento dos coeficientes de difusão em decorrência da diminuição da viscosidade. Contudo, normalmente a extração é executada a temperatura ambiente para

evitar a formação de bolhas e evaporação do solvente extrator durante a extração (DMITRIENKO et al., 2021; SHARIFI; ABBASI; NOSRATI, 2016). Já a agitação é aplicada rotineiramente. Como a fase aceptora se encontra protegida no interior da fibra oca, o sistema pode ser agitado a velocidades altas facilitando a difusão dos analitos para a fase aceptora. A agitação pode ser realizada através de agitação magnética ou banho ultrassônico (ALSHARIF et al., 2017; DMITRIENKO et al., 2021; PEDERSEN-BJERGAARD, 2019).

Por fim, a adição de sais à fase doadora pode ter efeitos diversos sobre a eficácia da extração. Por um lado, pode melhorar a extração, especialmente de analitos mais polares, devido ao efeito *salting-out* que diminui a solubilidade do analito na fase aquosa. Porém, há casos em que a interação do analito com os íons adicionados, bem como o aumento da viscosidade da matriz, podem reduzir a difusão do analito para a fase aceptora, prejudicando o processo de extração (ALSHARIF et al., 2017; DMITRIENKO et al., 2021). Os sais mais comumente utilizados são o cloreto e o sulfato de sódio, em concentrações de 3 a 5% (m/m) (PEDERSEN-BJERGAARD, 2019).

Adicionalmente, na HF $\mu$ E um parâmetro extra de otimização a ser estudado é referente à etapa de dessorção, em que podem ser avaliados o método de agitação (ultrassom, vórtex) e o tempo (IDE; NOGUEIRA, 2018, 2019b). Há ainda a possibilidade de estudo do uso de mais de uma fibra simultaneamente, as quais podem ser impregnadas com o mesmo solvente extrator, ou ainda solventes diferentes (IDE; NOGUEIRA, 2019a).

### 1.2.2 Aplicações da miroextração em fase líquida em Toxicologia Forense

Venson e colaboradores (2019), em um artigo de revisão sobre o uso da HF-LPME em Toxicologia Forense, demonstrou o crescente interesse pelo uso desta técnica. As principais matrizes utilizadas até o momento são plasma e urina. Ainda são poucos os estudos que utilizam sangue total como matriz para as análises, e esta é uma matriz de extrema importância na Toxicologia Forense já que reflete o momento em que houve a morte. Em busca na literatura de estudos utilizando as técnicas de microextração com membrana líquida suportada aqui descritas, foram encontrados apenas trabalhos utilizando HF-LPME (Tabela 2), demonstrando a necessidade da realização de estudos utilizando outras técnicas, como a HF $\mu$ E, que já demonstrou versatilidade para aplicação em diversas matrizes.

O sangue total contém vários compostos endógenos (proteínas e lipídeos) que interferem na análise cromatográfica, reforçando a necessidade de uma extração eficiente

para eliminar estes compostos antes da análise. Amostras coaguladas e hemolisadas são comuns (DOS SANTOS et al., 2014). Apesar da complexidade da amostra, em nenhum destes estudos foi necessário um pré-tratamento antes do procedimento de extração. Nos estudos em que houve comparação com uma segunda matriz, plasma (GRØNHAUG HALVORSEN; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2001) e urina (HALVORSEN et al., 2001), a extração ofereceu alto clean-up para ambas as matrizes, sendo necessário, porém, um maior tempo de extração para o sangue total devido à sua alta viscosidade. A saber, no trabalho de Menck e colaboradores (2012), com o uso do ultrassom como forma de agitação, foi possível a redução do tempo de extração, de 5 min, quando comparado a maioria dos trabalhos que empregaram de 15 a 60 min.

É possível observar pela Tabela 2 que os estudos utilizando técnicas de microextração em fase líquida com fibra oca concentram-se na determinação de medicamentos e drogas de abuso, havendo ainda poucos estudos de outras substâncias de interesse toxicológico, como os praguicidas, em matrizes de interesse forense.

### 1.3 PRAGUICIDAS

Os praguicidas podem ser definidos como qualquer substância química, ou mistura de substâncias, introduzidas no ambiente com o objetivo de prevenir, destruir, repelir ou mitigar pragas (COSTA, 2012). Os praguicidas podem ser classificados de acordo com o tipo de praga a ser controlada, por exemplo: inseticidas, fungicidas, herbicidas, raticidas, entre outros. Podem ser classificados também de acordo com a sua estrutura química, como organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, neonicotinoides, entre outros. Uma mesma classe química pode ser usada para o combate de diversos tipos de pragas (ALONZO; CORRÊA, 2014; FLANAGAN et al., 2008).

Idealmente, um praguicida deveria ser altamente seletivo, destruindo os organismos alvo sem causar nenhum dano aos demais. Mas, na realidade, a maioria dos praguicidas não é tão seletiva, sendo assim, responsáveis por inúmeros casos de intoxicações, o que torna seu estudo de grande interesse dentro da Toxicologia Forense (COPE; LEIDY; HODGSON, 2004).

A exposição pode ocorrer por via oral, dérmica ou inalatória. Altas doses por via oral podem advir da ingestão intencional em casos de suicídio, ou da ingestão acidental devido, principalmente, ao armazenamento em embalagens inadequadas. As vias dérmica e inalatória são as mais frequentes em exposições ocupacionais (LACASSIE et al., 2001).

TABELA 2 – ESTUDOS EMPREGANDO HF-LPME EM SANGUE TOTAL

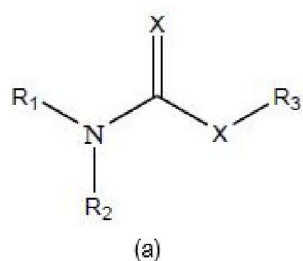
| Analitos                  | Fase doadora   | Fase orgânica       | Fase aceptora                 | Fibra           | Agitação        | Temperatura | Técnica   | Referência |
|---------------------------|--|---------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|-------------|-----------|------------|
| Anfetaminas               | 500 µL de amostra + 2,5 mL NaOH 0,1 mol/L (pH=12)        | Éter dihexílico     | 50 µL HCl 0,1 mol/L (pH=3)    | 8 cm - U        | 1500 rpm/30 min | 45°C        | GC/MS     | I          |
| Antidepressivos           | 500 µL de amostra + 3,5 mL NaOH 0,1 mol/L                | Dodecano            | 30 µL ácido fórmico 0,1 mol/L | 8 cm - U        | 1200 rpm/30 min | 55°C        | GC/MS     | II         |
| Barbitúricos              | 50 µL de amostra + 950 µL HCl 0,1 mol/L                  | Decanol             | 25 µL NaOH pH=13              | 9 cm - U        | Ultrassom/5 min | -           | GC/MS     | III        |
| Drogas básicas            | 500 µL de amostra + 1,0 mL tampão fosfato (pH=7,5)       | Nonanol             | 17 µL HCl                     | 1,8 cm - haste  | 1500 rpm/60 min | -           | LC/MS     | IV         |
| Metanfetamina, Citalopram | 2,5 mL de amostra + 125 µL NaOH 2 mol/L + água qsp 4mL   | Éter hexílico       | 25 µL HCl 0,1 mol/L           | 8 cm – enrolada | 1500 rpm/30 min | -           | CE        | V          |
| Anfetaminas               | 500 µL de amostra + 500µL NaOH 1 mol/L                   | Éter dihexílico     | 25 µL HCl 0,01 mol/L          | 8 cm - U        | 1500 rpm/15 min | -           | FIA-MS-MS | VI         |
| Antidepressivos           | 50 µL de amostra + 100 µL NaOH 2 mol/L + água qsp 1,5 mL | Acetato de dodecila | 15 µL                         | 1,8 cm - haste  | 1500 rpm/30 min | -           | LC/MS     | VII        |

GC: Cromatografia em fase gasosa; MS: Espectrometria de massas; LC: Cromatografia em fase líquida; CE: Eletroforese capilar; FIA: Análise por injeção em fluxo. I) BOMBANA et al., 2020; II) DOS SANTOS et al., 2014; III) MENCK et al., 2012; IV) UGLAND; KROGH; REUBSAET, 2003; V) GRØNHAUG HALVORSEN; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2001; VI) HALVORSEN et al., 2001; VII) HALVORSEN et al., 2003

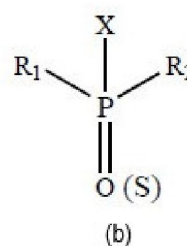
A grande variedade de compostos químicos com propriedades praguicidas significa que há uma ampla faixa de toxicidade em humanos. Mesmo dentro de uma mesma classe, a dose letal pode variar consideravelmente. Em alguns casos, o próprio veículo com que o produto é fabricado pode ser tóxico, podendo ser o principal agente causador dos sintomas (KALA, 2011).

No Brasil, o mercado de praguicidas expandiu-se rapidamente na última década, com ritmo maior do que o mercado global. Os carbamatos e os organofosforados (Figura 5) estão entre o mais utilizados na produção agrícola e nos ambientes domésticos, sendo, por isso, os principais agentes em casos de intoxicação aguda, tanto acidentais quanto intencionais (LANARO et al., 2018).

FIGURA 5 – ESTRUTURA BÁSICA DOS CARBAMATOS (a) E ORGANOFOSFORADOS (b)



X = O ou S  
R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> = H ou grupo alquila  
R<sub>3</sub> = subst. orgânico ou metal



R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> = grupo arila ou alquila  
X = grupo alifático, aromático,  
heterocíclico ou halogênio

FONTE: Adaptado de (COLOVIC et al., 2013)

As propriedades físico-químicas dos praguicidas podem variar consideravelmente de acordo com sua acidez e basicidade, presença de heteroátomos e volatilidade. Essa variedade prejudica o desenvolvimento de um método analítico universal, tornando a identificação de uma substância na matriz biológica extremamente complexa (KALA, 2011). Este fato ressalta a importância da Análise Toxicológica Sistemática discutida anteriormente.

As matrizes mais comumente utilizadas na análise de praguicidas são o sangue e a urina. O conteúdo gástrico também é uma matriz importante nos casos de ingestão oral (CHUNG; CHOE, 2018; SOARES et al., 2019). As técnicas de análise variam de acordo com as propriedades do analito. A maioria dos praguicidas são voláteis e termicamente estáveis, sendo compatíveis com a GC. Já para os termicamente instáveis e polares ou iônicos, a LC tem sido preferida (LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2007).

O grande número de casos de intoxicação que os praguicidas causam os tornam uma classe de compostos de interesse dentro da Toxicologia Forense. Embora a Polícia Científica do Paraná possua um método de Análise Toxicológica Sistemática que englobe a pesquisa destas substâncias, é importante a avaliação de um novo método de extração, que se encontre alinhado às novas tendências de técnicas miniaturizadas, com menor uso de solventes orgânicos e mais sustentáveis ambientalmente. Dentre essas técnicas, técnicas de microextração que utilizam fibra oca mostram-se bastante promissoras já que são técnicas com bom desempenho na extração de matrizes complexas. Essas técnicas já foram estudadas para extração de praguicidas, porém estes estudos concentram-se em análises ambientais e de alimentos (FARAJZADEH; SOROURADDIN; MOGADDAM, 2014; LAWAL; TAN; ALSHARIF, 2016; PROSEN, 2019). É importante também a validação de um método confirmatório que utilize uma técnica analítica diversa da primeira, visto que isso traz maior confiabilidade do resultado e robustez ao Laudo Pericial.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de método analítico baseado em microextração utilizando fibra oca e técnicas cromatográficas (Cromatografia Líquida com Detector por Arranjo de Diodos - LC-DAD e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas - GC/MS) para determinação de praguicidas em sangue total com fins de toxicologia forense.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação da eficiência da microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME) e da microextração com fibra oca (HF $\mu$ E) na triagem de praguicidas, por LC-DAD, em comparação com a técnica de extração líquido-líquido (LLE) utilizada atualmente no Laboratório de Toxicologia da Polícia Científica do Paraná;
- Otimização da técnica de extração para uma classe de praguicidas específica, a ser selecionada posteriormente de acordo com os resultados obtidos nas análises de triagem;
- Desenvolvimento e validação parcial de um método confirmatório para a classe de praguicidas selecionada por GC/MS;
- Aplicação do método desenvolvido em amostras reais de sangue total provenientes do Instituto Médico-Legal do Paraná.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 PADRÕES ANALÍTICOS

O estudo incluiu praguicidas que foram selecionados de acordo com a disponibilidade de padrão analítico, presença do espectro na biblioteca utilizada na Análise Toxicológica Sistemática e registro para uso no Brasil pela ANVISA (Tabela 3). À exceção, foi incluído o aldicarbe que, apesar de ser proibido pela ANVISA, é frequentemente encontrado no “chumbinho”, produto clandestino irregularmente utilizado como raticida (LANARO et al., 2018). Inicialmente, para os ensaios por LC-DAD, os analitos foram divididos em dois grupos, aqui chamados de Grupo A e Grupo B, de acordo com a fase móvel utilizada para sua eluição, conforme explanado na Seção 1.1.1.

TABELA 3 – ANALITOS DE ACORDO COM SUA AÇÃO E CLASSE QUÍMICA, E SUAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

(continua)

| <b>GRUPO A</b>          |                                   |                         |                                   |                         |            |
|-------------------------|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-------------------------|------------|
| <b>Ação<sup>a</sup></b> | <b>Classe química<sup>a</sup></b> | <b>Substância</b>       | <b>pKa</b>                        | <b>logP<sup>c</sup></b> |            |
| Herbicida               | Ácido Ariloxialcanoico            | 2,4-D                   | 2,7 <sup>b</sup>                  | -0,82                   |            |
|                         |                                   | Picloram                | 2,3 <sup>b</sup>                  | -1,92                   |            |
|                         |                                   | Bentazona               | 3,51 <sup>b</sup>                 | -0,46                   |            |
|                         |                                   | Ametrina                | 4,1 <sup>b</sup>                  | 2,63                    |            |
|                         |                                   | Atrazina                | 1,6 <sup>b</sup>                  | 2,7                     |            |
|                         |                                   | Ureia                   | Diurom                            | ND <sup>c</sup>         | 2,87       |
| Inseticida              | Carbamato                         | Linuron                 | ND <sup>c</sup>                   | 3                       |            |
|                         |                                   | Aldicarbe               | ND <sup>c</sup>                   | 1,15                    |            |
|                         |                                   | Bendiocarbe             | 8,8 <sup>c</sup>                  | 1,7                     |            |
|                         |                                   | Carbaril                | 10,4 <sup>c</sup>                 | 2,36                    |            |
|                         |                                   | Pirimicarbe             | 4,5 <sup>b</sup>                  | 1,7                     |            |
|                         |                                   | Propoxur                | ND <sup>c</sup>                   | 0,14                    |            |
|                         | Neonicotinoide                    | Metomil                 | ND <sup>c</sup>                   | 0,09                    |            |
|                         |                                   | Imidacloprida           | ND <sup>c</sup>                   | 0,57                    |            |
|                         |                                   | <b>GRUPO B</b>          |                                   |                         |            |
|                         |                                   | <b>Ação<sup>a</sup></b> | <b>Classe química<sup>a</sup></b> | <b>Substância</b>       | <b>pKa</b> |
| Herbicida               | Cloroacetanilida                  | Alacloro                | 0,62 <sup>c</sup>                 | 3,09                    |            |
|                         |                                   | Oxifluorfen             | ND <sup>c</sup>                   | 4,86                    |            |
|                         |                                   | Clorimuron etil         | 4,2 <sup>b</sup>                  | 2,5                     |            |
| Inseticida              | Organofosforado                   | Diazinon                | 2,6 <sup>b</sup>                  | 3,69                    |            |
|                         |                                   | Dissulfotom             | ND <sup>c</sup>                   | 3,95                    |            |
|                         |                                   | Clorpirifós             | ND <sup>c</sup>                   | 4,7                     |            |
|                         |                                   | Clorpirifós metil       | ND <sup>c</sup>                   | 4                       |            |
|                         |                                   | Terbufós                | ND <sup>c</sup>                   | 4,51                    |            |

TABELA 3 – ANALITOS DE ACORDO COM SUA AÇÃO E CLASSE QUÍMICA, E SUAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

|          |            | (continuação) |                   |      |
|----------|------------|---------------|-------------------|------|
|          | Piretroide | Aletrina      | ND <sup>c</sup>   | 4,78 |
| Raticida | Cumarínico | Brodifacum    | 4,5 <sup>b</sup>  | 6,12 |
|          |            | Bromadiolona  | 4,5 <sup>b</sup>  | 4,07 |
|          |            | Cumatetralil  | 4,5 <sup>b</sup>  | 3,46 |
|          |            | Difenacuma    | 4,84 <sup>b</sup> | 7,6  |
|          | Indandiona | Difacinona    | ND <sup>c</sup>   | 4,85 |

pKa: constante de dissociação ácida, logP: coeficiente de partição octanol:água, ND: não se dissocia  
 FONTES: a) ANVISA; b) PubChem Database; c) Pesticide Properties Database

Os padrões analíticos sólidos de alta pureza foram fornecidos pela Polícia Científica/PR. Foram preparadas soluções estoque na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup> em metanol grau HPLC (Dinâmica<sup>®</sup>), as quais foram armazenadas em geladeira e diluídas para os ensaios. Excetuam-se os padrões de brodifacum, clorimurom etil e difenacum, preparadas em acetona grau HPLC (J. T. Baker<sup>®</sup>) devido à baixa solubilidade destes compostos em metanol.

A partir das soluções estoque, foram preparadas duas misturas de padrões em que os analitos foram divididos de acordo com a fase móvel adequada para sua eluição, A ou B, conforme método desenvolvido por Pragst e colaboradores (2004) e os ensaios de cada grupo por LC-DAD foram realizados separadamente.

Para as análises por GC/MS, foi preparada mistura dos padrões selecionados em acetona grau HPLC, também na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>. Além disso, foram ainda preparadas soluções dos compostos azobenzeno, clorbromurom, etiona e etrinfós para avaliação do uso como padrão interno.

### 3.2 REAGENTES

Para o preparo das soluções tampão fosfato para a fase móvel e para a extração, foram utilizados os reagentes de grau PA ácido fosfórico e fosfato monobásico de potássio (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), e fosfato dibásico de potássio (Merck<sup>®</sup>). Para o tampão acetato, foram utilizados ácido acético e hidróxido de sódio (Merck<sup>®</sup>). Foi utilizado, ainda, ácido clorídrico (Merck<sup>®</sup>) e solução de hidróxido de sódio para ajuste de pH nas extrações.

O solvente utilizado para composição da fase móvel foi acetonitrila grau HPLC (Dinâmica<sup>®</sup>). Demais solventes, utilizados para extração, foram utilizados 1-octanol (Sigma-

Aldrich<sup>®</sup>), acetato de butila (Quimex<sup>®</sup>), acetato de etila (Mallinckrodt<sup>®</sup>), hexano (Panreac<sup>®</sup>), diclorometano (Honeywell<sup>®</sup>), tolueno e clorofórmio (Merck<sup>®</sup>).

A água ultrapura (resistividade 18,2 MΩ .cm a 25°C) utilizada nos ensaios foi obtida em sistema ELGA LabWater<sup>®</sup>.

### 3.3 INSTRUMENTAÇÃO

As análises por cromatografia em fase líquida foram realizadas em sistema de LC-DAD constituído de um cromatógrafo líquido acoplado a detector de arranjo de diodos, ambos da marca Agilent Technologies<sup>®</sup>, modelo 1260 Infinity II. Os dados obtidos foram analisados em software OpenLab EZ versão A.04.10. As fases móveis e condições de análise foram realizadas de acordo com a metodologia desenvolvida por Pragst e colaboradores (2004), a qual é utilizada na rotina do Laboratório de Toxicologia da Polícia Científica do Paraná.

A separação foi realizada em coluna de octilsilano (LiChrospher<sup>®</sup> RP-8, 250 mm x 4,6 mm, 5µm) com controle de temperatura em 30°C, pré-coluna de fase estacionária similar e eluição isocrática na vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>. A aquisição dos espectros pelo detector de arranjo de diodos foi realizada na faixa de comprimento de onda de 195 a 380 nm. A injeção foi realizada por amostrador automático com loop de 25 µL.

Para composição da fase móvel foram utilizados acetonitrila grau HPLC (Dinâmica<sup>®</sup>) e tampão fosfato pH 2,3 na concentração 25 mmol L<sup>-1</sup>. Os componentes foram misturados em duas proporções distintas, 37:63 v/v (ACN:tampão - Fase A) e 63:37 v/v (ACN:tampão Fase B). As fases móveis assim preparadas foram então filtradas através de membrana de celulose regenerada (0,45 µm, 47 mm Sartorius<sup>®</sup>).

Foi avaliada a resolução dos analitos nas condições cromatográficas utilizadas através da seguinte fórmula:

$$R_S = \frac{2 (t_{R2} - t_{R1})}{(w_{b2} + w_{b1})}$$

R<sub>S</sub>: resolução, t<sub>R</sub>: tempo de retenção, w<sub>b</sub>: largura do pico na base

As análises por GC/MS foram realizadas em cromatógrafo a gás da marca Shimadzu<sup>®</sup>, modelo GCMS2010 Plus, acoplado a espectrômetro de massas do tipo triplo

quadrupolo, modelo TQ8040, também Shimadzu®. As condições de análise estão sumarizadas na Tabela 4. Os dados obtidos foram analisados em software GCMS Solution.

TABELA 4 – CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

|         |                                       |   |
|---------|---------------------------------------|---|
| Injetor | Temperatura do injetor                | 300 °C  |
|         | Volume de injeção                     | 1 µL  |
|         | Modo de injeção                       | Splitless   |
| GC      | Coluna                                | SH-Rtx-5MS (Shimadzu)<br>30,0m x 0,25 mm x 0,25 µm  |
|         | Gás de arraste                        | Hélio   |
|         | Fluxo do gás de arraste               | 1,02 mL/min   |
|         | Rampa de aquecimento                  | 75 °C (3 min)<br>20 °C min <sup>-1</sup> até 205 °C<br>30 °C min <sup>-1</sup> até 250 °C (4 min) |
|         | Temperatura da linha de transferência | 275 °C  |
|         | Temperatura da fonte de ionização     | 250 °C  |
| MS      | Analizador de massas                  | Triplo quadrupolo   |
|         | Energia de ionização                  | 70 eV   |
|         | Modo de registro dos íons             | Full Scan; SIM  |

GC: Cromatógrafo em fase gasosa; MS: Espectrômetro de massas; SIM: monitoramento seletivo de íons.

FONTE: A AUTORA

### 3.4 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO

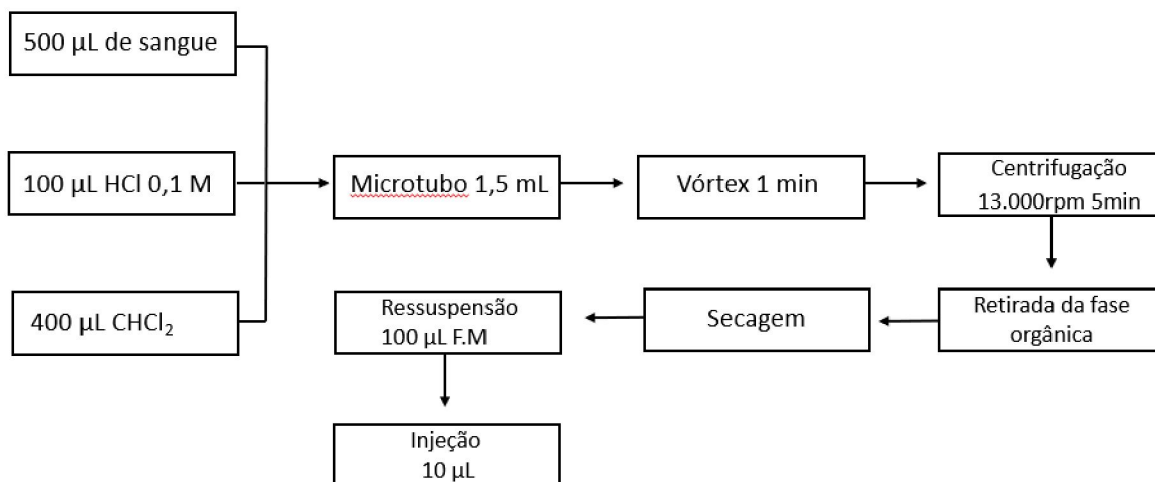
#### 3.4.1 Extração líquido-líquido

Foi realizada a extração líquido-líquido conforme descrito por Pragst e colaboradores (2004) e expresso no fluxograma contido na Figura 6. Para isto, em um microtubo de centrifugação de 1,5 mL, foram adicionados 25 µL da solução mix de padrões na concentração de 20 µg mL<sup>-1</sup>. O solvente foi então seco em fluxo de nitrogênio e, após a secura, foi adicionado 500 µL de sangue branco de matriz e o microtubo submetido à agitação em vórtex, resultando na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup> de sangue. Para o procedimento de extração, foram adicionados ácido clorídrico e diclorometano. O eppendorf então foi submetido à agitação em vórtex por um minuto e, posteriormente, à centrifugação. O extrato assim obtido foi recolhido e transferido para um vial, seco e ressolubilizado com fase móvel no momento da injeção.

Para avaliar a eficiência da extração através da área de pico obtida, foi realizada também a extração de amostras de sangue branco de matriz, seguindo-se o mesmo

procedimento. Após o processo de extração, foi adicionado 25  $\mu\text{L}$  da solução mix dos analitos ao extrato obtido. A eficiência da extração foi calculada através da divisão da área de pico obtida após a extração dos analitos pela área referente ao 100% (adição dos analitos após a extração). O resultado foi multiplicado por 100 para ser expresso em % da área do pico.

FIGURA 6 –FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO



FONTE: A AUTORA

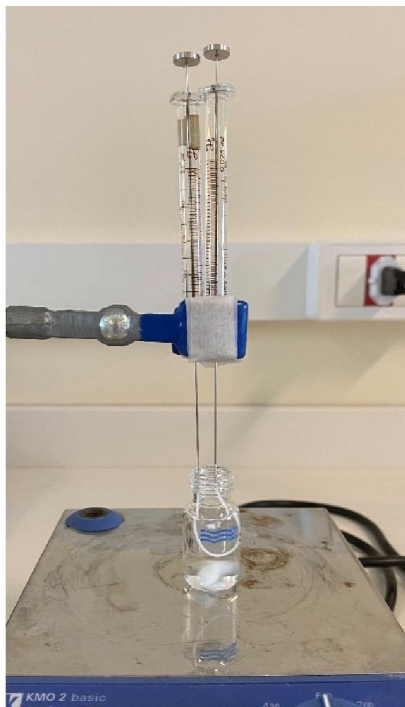
### 3.4.2 Técnicas de microextração com fibra oca

Para as técnicas de extração de microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME) e microextração com fibra oca (HF $\mu$ E), foram utilizadas fibras ocas hidrofóbicas de polipropileno (Q3/2 Accurel, Membrana<sup>®</sup>) com diâmetro interno de 600  $\mu\text{m}$ , espessura da parede de 200  $\mu\text{m}$  e tamanho de poros de 0,2  $\mu\text{m}$ . As fibras foram cortadas, com auxílio de tesoura, no comprimento adequado e, então, submetidas a banho ultrassônico (Elma<sup>®</sup>, modelo Easy Elmassonic) em acetona para limpeza, com posterior secagem ao ar livre.

A técnica de HF-LPME foi realizada na configuração em “U” (Figura 7), utilizando-se duas microsseringas de 25  $\mu\text{L}$  para suporte da fibra e inserção e coleta da fase aceptora. Com uma das seringas, aspirou-se 20  $\mu\text{L}$  da fase aceptora. As seringas foram então, inseridas nas extremidades da fibra oca com comprimento de 8 cm, a qual foi mergulhada no solvente 1-octanol durante 20 segundos para impregnação dos poros (fase extratora). Após a impregnação do solvente, a fase aceptora foi injetada no lúmen da fibra e o sistema imerso no vial de 10 mL contendo a fase doadora. O sistema foi mantido sob agitação magnética

(agitador Ika-Werke<sup>®</sup>, modelo KMO2 basic) a 600 rpm por 30 minutos. Após esse período, a fase aceitadora foi aspirada e transferida para um vial com insert de 250  $\mu\text{L}$ .

FIGURA 7 – SISTEMA DE EXTRAÇÃO POR HF-LPME EM “U”



FONTE: A AUTORA

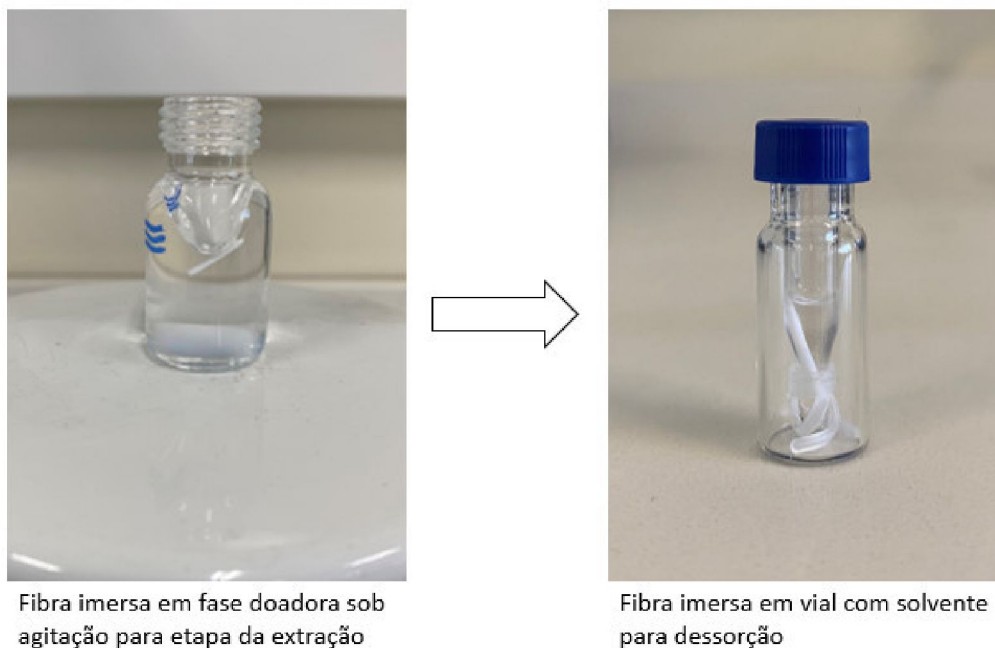
Para o sistema em duas fases (fase aceitadora orgânica), o extrato foi seco e ressolubilizado com 100  $\mu\text{L}$  de fase móvel. Já no sistema em 3 fases (fase aceitadora aquosa), o volume no insert foi completado adicionando-se 80  $\mu\text{L}$  de fase móvel. Em ambos os casos, foi injetado 25  $\mu\text{L}$  no sistema cromatográfico. Entre as extrações, as microseringas foram lavadas com acetona, aspirando-se e descartando o solvente por 10 vezes consecutivas.

Na técnica de HF $\mu\text{E}$  (Figura 8), foram utilizadas fibras cortadas no comprimento de 1 cm. A fibra foi mergulhada por 20 segundos em 1-octanol para impregnação dos poros e, posteriormente, adicionada à fase doadora sob agitação magnética a 600 rpm. Após o período de extração (30 minutos), a fibra foi retirada da fase doadora com o auxílio de uma pinça e inserida em um vial com insert de 250  $\mu\text{L}$  contendo 100 $\mu\text{L}$  do solvente para dessorção. A dessorção foi realizada em banho ultrassônico por cinco minutos.

Os primeiros ensaios foram realizados utilizando-se os padrões na concentração de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em água ultrapura. A partir da etapa de otimização do processo de extração para o método utilizando GC/MS, a água ultrapura foi substituída por sangue branco de matriz. Além disso, foi adicionado o padrão interno na concentração de 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Nos dois sistemas, a fase doadora foi composta de 500  $\mu\text{L}$  da água ou sangue fortificado com os

analitos e 7,5 mL de solução para ajuste do pH, totalizando um volume de 8 mL, em um vial de 10 mL. Foram mantidas as condições de agitação a 600 rpm e 30 minutos de extração, as quais foram posteriormente otimizadas.

FIGURA 8 – MICROEXTRAÇÃO COM FIBRA OCA (HF $\mu$ E)



FONTE: A AUTORA

Nos primeiros ensaios, as extrações em meio ácido foram realizadas através da adição de ácido clorídrico 0,1 M e em meio básico com hidróxido de sódio 0,1 M. No sistema HF-LPME em 3 fases, essas mesmas soluções foram utilizadas como fase aceptora. Para os ensaios de avaliação do pH da fase doadora, foram utilizados tampões fosfato nos pHs 3, 6 e 7, e tampão acetato nos pHs 4 e 5.

Foram avaliados dois solventes para dessorção da fibra na HF $\mu$ E, metanol e acetonitrila, previamente à análise por LC-DAD. Foi realizada extração da água ultrapura adicionada dos analitos em meio ácido e a dessorção através da imersão da fibra em um vial contendo 100  $\mu$ L do solvente, e posterior agitação em ultrassom por 5 minutos a temperatura ambiente. Para cada solvente de dessorção, o processo foi realizado em triplicata.

Para a análise por GC/MS foram avaliados os solventes hexano, acetato de etila e acetona para a dessorção. O ensaio foi realizado utilizando água ultrapura adicionada dos analitos e do padrão interno, da mesma forma descrita anteriormente, em duplicata para cada solvente. Foi avaliada também a agitação em vórtex a 2500 rpm.

### 3.5 AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL

As amostras de sangue total utilizadas são amostras coletadas de cadáveres no Instituto Médico-Legal do Paraná, as quais foram previamente analisadas pelo Laboratório de Toxicologia da Polícia Científica do Paraná e sabidamente livres dos analitos alvo deste projeto, e que seriam destinadas ao descarte. Seu uso foi autorizado pelo Diretor Geral da Polícia Científica via Academia de Ciências Forenses desta Instituição.

### 3.6 OTIMIZAÇÃO DA MICROEXTRAÇÃO COM FIBRA OCA

Os ensaios de otimização da HF $\mu$ E foram realizados com amostras de sangue fortificadas com os analitos na concentração de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e o padrão interno na concentração de 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Foram avaliados de forma multivariada os parâmetros pH, velocidade de agitação e adição de sal, utilizando um planejamento experimental Box-Behnken. Para ajuste do pH, foram utilizados tampões fosfato pHs 2 e 6, e tampão acetato pH 4. A velocidade de agitação foi ajustada entre 600 e 1.000 rpm. O efeito da adição de sal foi avaliado através da adição de sulfato de sódio anidro P.A. (Synth) entre as concentrações 0 e 5% (m/v). Nestes ensaios, o tempo de extração foi fixado em 30 minutos.

Determinadas as melhores condições dos fatores previamente avaliados, foi realizada a otimização univariada do tempo. Foram realizadas extrações na condição otimizada, em triplicata, com tempos de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. Foi avaliada a área de pico obtida para cada analito e para o padrão interno em função do tempo.

### 3.7 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MÉRITO

Para o início da avaliação dos parâmetros de mérito, foram seguidas as diretrizes de validação de métodos em Toxicologia Forense da *American Academy of Forensic Sciences* (2019). Foram avaliados os parâmetros seletividade, lineariedade e *carryover*.

#### 3.7.1 Seletividade

Para o ensaio de seletividade, foram avaliados diversos analitos, incluindo drogas de abuso e medicamentos. Foram incluídos no ensaio os compostos cafeína, cocaína, MDA

(metilendioxianfetamina), MDMA (metilendioximetanfetamina), diclofenaco, paracetamol, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, codeína, fluoxetina, imipramina, nortriptilina, bromazepam e diazepam. Os compostos foram adicionados ao sangue branco de matriz na concentração  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  e o sangue foi submetido à extração otimizada e posterior análise por GC/MS.

Foi avaliada também a influência de interferentes da matriz através da extração de dez amostras de sangue provenientes de indivíduos diferentes, sem adição de analitos e padrão interno, e posterior análise por GC/MS.

### 3.7.2 Lineariedade (Modelo de Calibração)

Para a avaliação da lineariedade foram construídas curvas analíticas com amostras de sangue fortificadas com os analitos de interesse em 6 (seis) níveis de concentração conforme Tabela 5. A avaliação é feita a partir do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e da análise dos resíduos.

TABELA 5 – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA

| Nível | Concentração ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) |
|-------|--------------------------------------|
| 1     | 50                                   |
| 2     | 100                                  |
| 3     | 200                                  |
| 4     | 400                                  |
| 5     | 600                                  |
| 6     | 800                                  |

### 3.7.3 Carryover

A presença de *carryover* após o ponto da curva de calibração de maior concentração é avaliada através da injeção de um branco após o último ponto das curvas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os primeiros ensaios foram realizados com o objetivo de comparar as técnicas de microextração em fibra oca (HF $\mu$ E) e microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME) com a técnica de extração líquido-líquido (LLE), sendo esta, preconizada na triagem toxicológica atualmente em uso pelo Laboratório de Toxicologia da Polícia Científica do Paraná e desenvolvida por Pragst e colaboradores (2004). Nesta etapa, as análises foram realizadas por Cromatografia a Líquido com Detector de Arranjo de Diodos (LC-DAD) utilizando-se as condições já estabelecidas pela metodologia em questão (da mesma forma que as análises de triagem são realizadas).

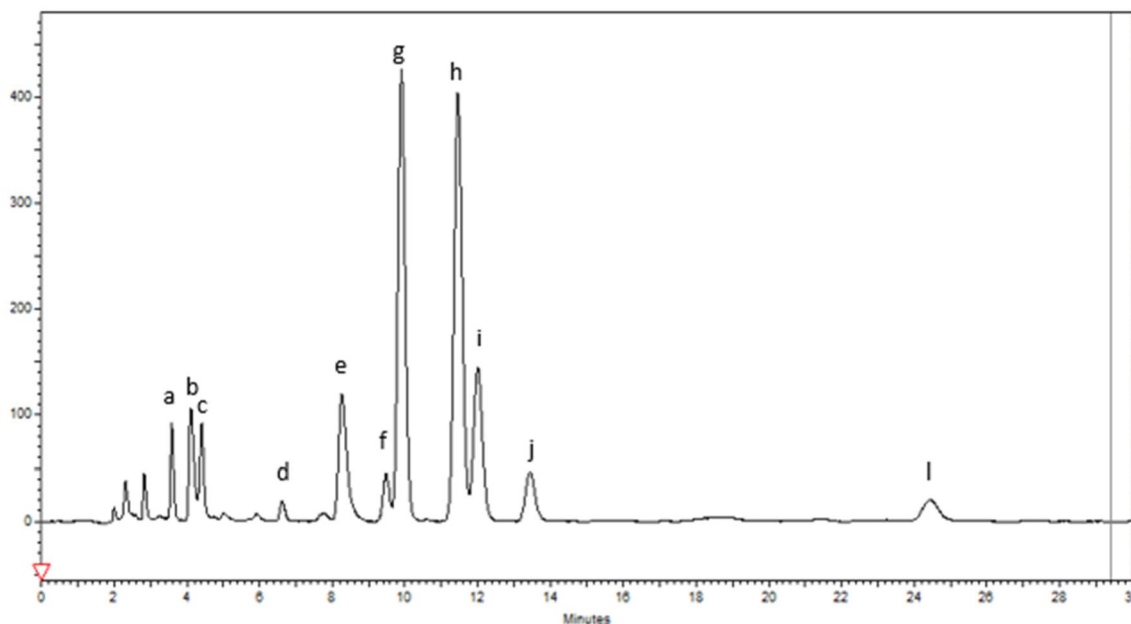
Como, na etapa de triagem, é de interesse que o maior número de substâncias possível seja detectado, este foi o principal fator utilizado para comparação entre as técnicas de extração.

### 4.1 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E DA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Para avaliação da extração líquido-líquido atualmente em uso no Laboratório de Toxicologia da Polícia Científica do Paraná, amostras branco de sangue total foram fortificadas com os analitos na concentração de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e submetidas à extração conforme método preconizado (descrito na seção 3.4.1). Os extratos assim obtidos foram analisados por LC-DAD, onde a aquisição dos dados foi realizada em varredura entre os comprimentos de onda de 195 e 380 nm, conforme preconizado no método para possibilitar a comparação dos espectros obtidos com a biblioteca de referência desenvolvida por Pragst e colaboradores (2004). Para a avaliação dos parâmetros de resolução e eficiência da extração foi utilizado o comprimento de onda de 220 nm por ser um comprimento em que todas os analitos apresentam absorção razoável para detecção.

Na Figura 9, é possível observar o cromatograma obtido após extração dos analitos do grupo A. A Tabela 6 apresenta os parâmetros tempo de retenção ( $t_R$ ), largura da base do pico ( $w_b$ ), resolução ( $R_s$ ) e a estimativa da eficiência da extração através da área do pico (% área), de cada pico, na ordem de eluição. A resolução, calculada entre picos adjacentes no cromatograma, é expressa em referência ao analito da mesma linha e o da linha subsequente da tabela.

FIGURA 9 – CROMATOGRAMA OBTIDO EM 220 nm APÓS EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO E ELUIÇÃO COM FASE MÓVEL A (37:63 v/v (ACN:tampão)).



a: metomil, b: pirimicarbe, c: imidacloprida, d: aldicarbe, e: ametrina, f: propoxur, g: bendiocarbe, h: carbaril, i: atrazina, j: diurom, l: linurom

FONTE: A AUTORA

TABELA 6 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS DOS ANALITOS DO GRUPO A E EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO LÍQUIDO LÍQUIDO

| Analito       | $t_R$ | $w_b$ | $R_s$ | Eficiência da extração (% área) |
|---------------|-------|-------|-------|---------------------------------|
| Metomil       | 3,58  | 0,42  | 1,32  | 71,27                           |
| Pirimicarbe   | 4,11  | 0,38  | 0,81  | 64,87                           |
| Imidacloprida | 4,41  | 0,36  | 5,77  | 65,75                           |
| Aldicarbe     | 6,63  | 0,41  | 4,23  | 71,82                           |
| Ametrina      | 8,26  | 1,00  | 1,71  | 57,35                           |
| Propoxur      | 9,49  | 0,44  | 0,66  | 65,58                           |
| Bendiocarbe   | 9,91  | 0,84  | 1,77  | 66,20                           |
| Carbaril      | 11,45 | 0,90  | 0,66  | 57,36                           |
| Atrazina      | 12,01 | 0,80  | 1,70  | 43,75                           |
| Diurom        | 13,45 | 0,89  | 9,75  | 57,63                           |
| Linurom       | 24,42 | 1,36  |       | 55,30                           |

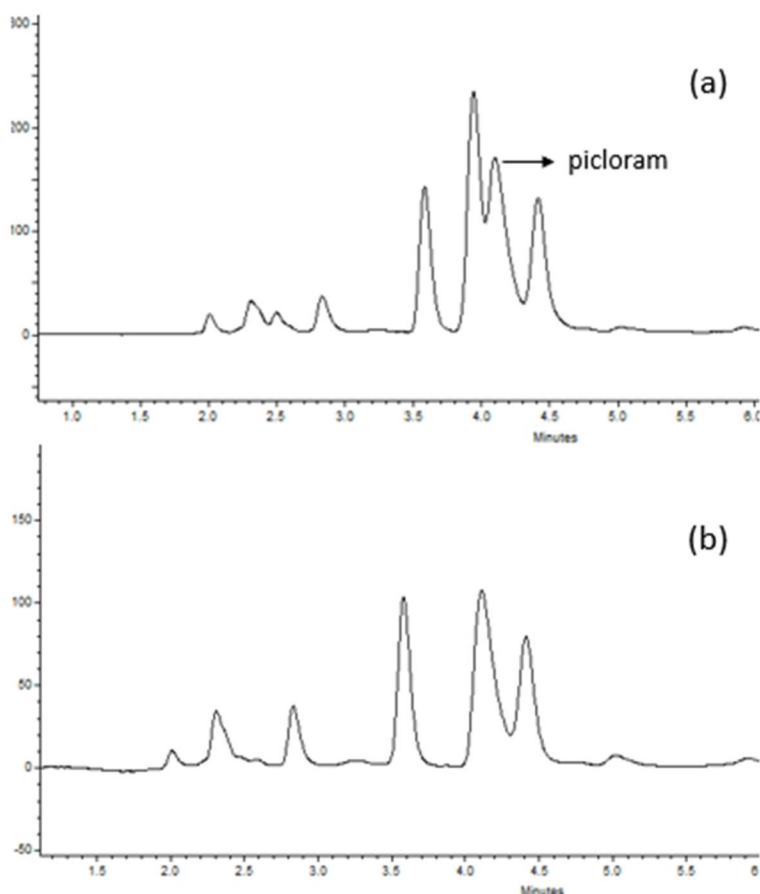
$t_R$ : tempo de retenção,  $w_b$ : largura do pico na base,  $R_s$ : resolução

O parâmetro de resolução ( $R_s$ ) expressa a separação entre dois compostos. Quando  $R_s = 1$ , os dois picos são razoavelmente separados. Para fins quantitativos, é necessário um valor de  $R_s$  de, pelo menos, 1,25, enquanto valores superiores a 1,5 indicam separação completa (COLLINS, 2017). Pela Tabela 6, é possível notar que não foi observada resolução

suficiente (inferior a 1) entre os analitos pirimicarbe e imidacloprida ( $R_s = 0,81$ ), propoxur e bendiocarbe ( $R_s = 0,66$ ), e carbaril e atrazina ( $R_s = 0,66$ ). Porém, como neste momento do estudo, está sendo avaliada apenas a capacidade de detecção do método, tal fato não foi limitante.

Não foram detectados, após a extração, os analitos picloram, bentazona e 2,4-D. Os três compostos podem ser visualizados no cromatograma em que os analitos foram adicionados após a extração. Na Figura 10, por exemplo, é possível observar o pico referente ao picloram no cromatograma obtido após análise do extrato em que os analitos foram adicionados depois da extração (Figura 10a). No cromatograma em que os analitos passaram pelo processo de extração, não foi detectado o composto picloram (Figura 10b).

FIGURA 10 – CROMATOGRAMAS COM ADIÇÃO DE PADRÃO APÓS A EXTRAÇÃO (a) E ADIÇÃO DE PADRÃO ANTES DA EXTRAÇÃO (b)

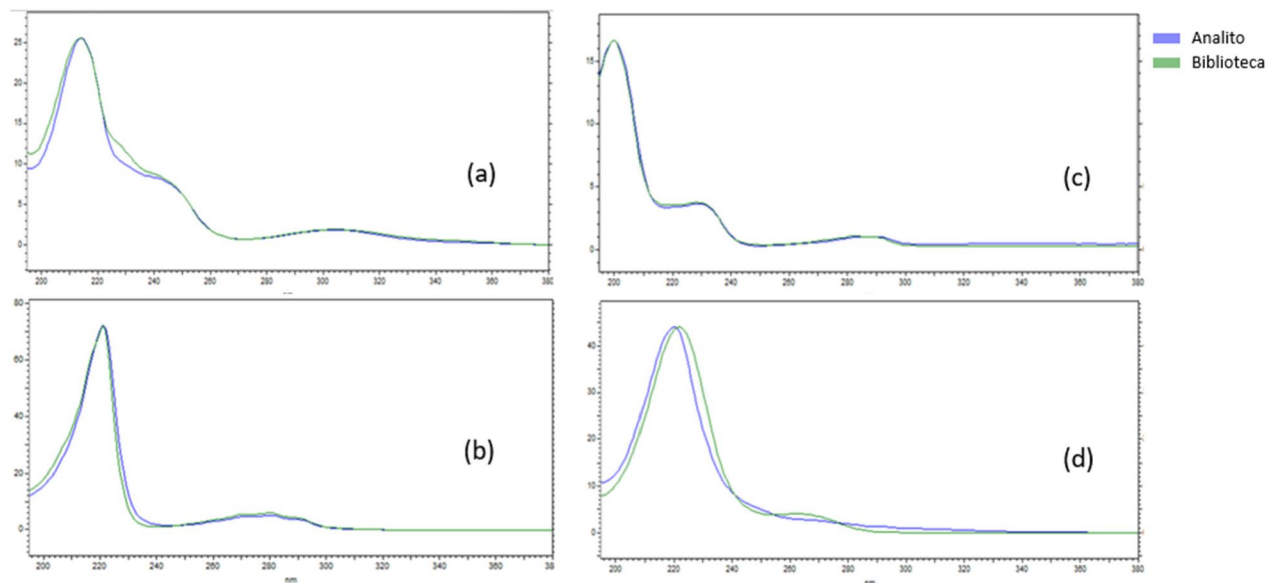


FONTE: A AUTORA

Já no caso dos outros analitos, houve coeluição da bentazona com o carbaril, e do 2,4-D com a atrazina, sendo possível observar apenas um pico no cromatograma em ambos os casos. Porém, o uso da biblioteca desenvolvida por Pragst e colaboradores (2004),

ameniza o efeito da coeluição, já que os compostos podem ser identificados pelo espectro obtido pelo DAD, como pode ser observado na Figura 11, que traz a comparação dos espectros dos compostos bentazona, carbaril, 2,4-D e atrazina com os espectros de referência da biblioteca.

FIGURA 11 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DOS ANALITOS BENTAZONA (a), CARBARIL (b), 2,4-D (c) E ATRAZINA (d) COM A BIBLIOTECA



FONTE: A AUTORA

Os três compostos do grupo A que não foram extraídos pela técnica de LLE são os compostos mais polares, com menor valor de  $\log P$  (picloram:  $\log P = -1,92$ , 2,4-D:  $\log P = -0,82$ , e bentazona:  $\log P = -0,46$ ), o que pode dificultar sua transferência para o solvente orgânico durante a extração.

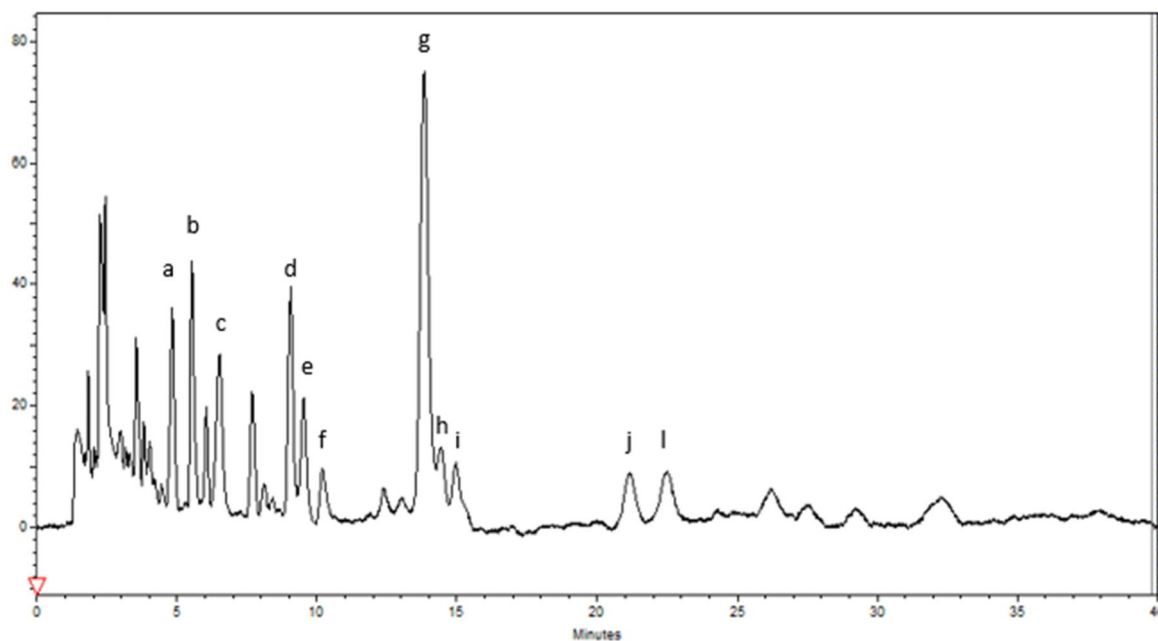
Em contrapartida, os analitos que apresentaram melhor eficiência da extração, superior a 60%, foram os de polaridade intermediária dentre os analisados, com  $\log P$  entre 0,09 e 1,7 (vide Tabela 3): metomil, pirimicarbe, imidacloprida, aldicarbe, propoxur e bendiocarbe. Já os menos polares, com  $\log P$  acima de 2, apresentaram eficiência de extração entre 40 e 60% (ametrina, atrazina, diurom e linurom).

Para os analitos do grupo B, a Figura 12 ilustra o cromatograma obtido após a extração líquido-líquido, e a Tabela 7 traz os parâmetros cromatográficos.

É possível visualizar, observando o cromatograma, que a análise na fase móvel B apresenta mais interferentes do que a na fase móvel A. Como a fase móvel B tem uma maior proporção de acetonitrila quando comparada com a fase móvel A, é possível presumir que

estes interferentes sejam constituintes endógenos de natureza apolar que, na análise em fase A, ficam retidos.

FIGURA 12 - CROMATOGRAMA OBTIDO EM 220 nm APÓS EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO E ELUIÇÃO COM FASE MÓVEL B (63:37 v/v (ACN:tampão)).



a: clorimurum etil, b: cumatetralil, c: alaclor, d: diazinon, e: clorpirifós metil, f: difacinona, g: aletrina h: difenacum, i: clorpirifós, j: brodifacum (isômero I) l: brodifacum (isômero II)  
 FONTE: A AUTORA

TABELA 7 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS DOS ANALITOS DO GRUPO B E EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO LÍQUIDO LÍQUIDO

| Analito           | $t_R$ | $w_b$ | $R_s$ | Eficiência da extração (% área) |
|-------------------|-------|-------|-------|---------------------------------|
| Clorimurum etil   | 4,82  | 0,47  | 1,56  | 89,96                           |
| Cumatetralil      | 5,53  | 0,44  | 1,69  | 42,65                           |
| Alaclor           | 6,53  | 0,74  | 3,97  | 83,04                           |
| Diazinon          | 9,05  | 0,53  | 0,8   | 79,84                           |
| Clorpirifós metil | 9,5   | 0,67  | 1,05  | 59,91                           |
| Difacinona        | 10,2  | 0,61  | 4,79  | 41,10                           |
| Aletrina          | 13,84 | 0,91  | 0,84  | 80,71                           |
| Difenacum         | 14,42 | 0,47  | 0,79  | 77,66                           |
| Clorpirifós       | 14,96 | 0,89  | 5,94  | 76,22                           |
| Brodifacum I      | 21,17 | 1,2   | 1,03  | 76,82                           |
| Brodifacum II     | 22,48 | 1,33  |       | 85,44                           |

$t_R$ : tempo de retenção,  $w_b$ : largura do pico na base,  $R_s$ : resolução

De uma maneira geral, os analitos do grupo B apresentaram uma eficiência de extração superior aos do grupo A. À exceção dos analitos cumatetralil, clorpirifós metil e

difacinona, os demais apresentaram valores superiores 70%. Não foi possível estabelecer uma correlação direta entre os valores de eficiência de extração e a polaridade dos analitos da mesma forma que no grupo A, sugerindo que a presença dos interferentes influencie no perfil de extração destes compostos. Não foram visualizados os analitos bromadiolona, terbufós, dissulfotom e oxifluorfem tanto no cromatograma obtido após a extração líquido-líquido quanto no cromatograma em que os analitos foram adicionados posteriormente ao extrato, o que também pode ter sido decorrência da alta presença de interferentes, demonstrando que, neste caso, a LLE não foi capaz de promover um clean-up eficiente da amostra. Este fato já era esperado, uma vez que a LLE não se trata de uma técnica de extração seletiva e sim baseada na interação, em termos de solubilidade, dos compostos entre dois solventes.

#### 4.2 SELEÇÃO DO SISTEMA DE EXTRAÇÃO

Para o estudo das técnicas miniaturizadas em fase líquida, foram avaliadas duas técnicas de microextração com fibra oca. A técnica de HF-LPME na conformação em “U”, por proporcionar uma maior quantidade de fase aceptora, e a HF $\mu$ E, por ser uma técnica que facilita o processo de extração uma vez que não necessita de uso de microsseringas. Como a triagem deve abranger o maior número de compostos possível, foi avaliado qual sistema de extração atingiria este objetivo. A eficiência da extração não foi levada em consideração neste momento já que os métodos não foram otimizados.

Os primeiros ensaios foram realizados ajustando-se o pH da fase doadora com ácido clorídrico 0,1 mol L<sup>-1</sup>, da mesma maneira que foi realizada a LLE apresentada anteriormente.

A Tabela 8 mostra quais analitos foram extraídos em cada condição, em comparação com a LLE. No grupo A, os mesmos analitos foram extraídos pela HF $\mu$ E e pela HF-LPME em 2 fases nas mesmas condições de tempo e agitação, utilizando o mesmo solvente (1-octanol), 7 em 14. No grupo B, a HF $\mu$ E foi capaz de extrair dois analitos a mais (9 por HF-LPME e 7 por HF $\mu$ E). Tal fato possivelmente é explicado devido à maior superfície de contato entre a fibra e a fase doadora já que a fibra circula livremente e de maneira aleatória, enquanto que a técnica de HF-LPME depende da difusão dos analitos da amostra para a fibra estática.

TABELA 8 – COMPARAÇÃO ENTRE LLE, HF-LPME EM 2 FASES E HF $\mu$ E

|               | GRUPO A     |                    |            | GRUPO B           |     |                    |            |
|---------------|-------------|--------------------|------------|-------------------|-----|--------------------|------------|
|               | pH FD ácido |                    |            | pH FD ácido       |     |                    |            |
|               | LLE         | HF-LPME<br>2 fases | HF $\mu$ E |                   | LLE | HF-LPME<br>2 fases | HF $\mu$ E |
| 2,4-D         |             | ✓                  | ✓          | Alaclor           | ✓   | ✓                  | ✓          |
| Aldicarbe     | ✓           |                    |            | Aletrina          | ✓   | ✓                  | ✓          |
| Ametrina      | ✓           |                    |            | Brodifacum        | ✓   |                    |            |
| Atrazina      | ✓           | ✓                  | ✓          | Bromadiolona      |     |                    |            |
| Bendiocarbe   | ✓           | ✓                  | ✓          | Clorimurom etil   | ✓   | ✓                  | ✓          |
| Bentazona     |             |                    |            | Clorpirifós       | ✓   | ✓                  | ✓          |
| Carbaril      | ✓           | ✓                  | ✓          | Clorpirifós-metil | ✓   | ✓                  | ✓          |
| Diurom        | ✓           | ✓                  | ✓          | Cumatetralil      | ✓   | ✓                  | ✓          |
| Imidacloprida | ✓           |                    |            | Diazinon          | ✓   | ✓                  | ✓          |
| Linurom       | ✓           | ✓                  | ✓          | Difacinona        | ✓   |                    |            |
| Metomil       | ✓           |                    |            | Difenacum         | ✓   |                    |            |
| Picloram      |             |                    |            | Dissulfotom       |     |                    | ✓          |
| Pirimicarbe   | ✓           |                    |            | Oxifluorfem       |     |                    | ✓          |
| Propoxur      | ✓           |                    |            | Terbufós          |     |                    |            |

HF-LPME: microextração em fase líquida suportada com fibra oca; HF $\mu$ E: microextração em fibra oca; FD: fase doadora.

✓: analitos que foram extraídos em termos de presença de picos cromatográficos.

Como a seleção de analitos inclui compostos ionizáveis, a HF-LPME em 3 fases também foi avaliada em comparação com a HF $\mu$ E, tanto na condição com fase doadora ácida e aceptora básica quanto na inversa (fase doadora básica e aceptora ácida). Para composição das fases ácidas, foi utilizada solução de HCl 0,1 M, enquanto para as fases básicas foi usado NaOH 0,1 M. Os resultados obtidos comparando as duas técnicas estão expressos na Tabela 9.

No grupo A, a HF-LPME em 3 fases com fase doadora em pH ácido e fase aceptora em pH básico foi capaz de extrair os analitos 2,4-D, bentazona e picloram, os quais foram os únicos analitos que não foram extraídos pela LLE. Os três analitos são os mais polares dentre os compostos do grupo A (valores de log P iguais a -0,82, -0,46 e -1,92, respectivamente), como já discutido anteriormente. Além disso, os três compostos possuem natureza ácida (pKa entre 2,3 e 3,51), sendo que o 2,4-D e o picloram possuem em sua estrutura a função ácido carboxílico, enquanto que a bentazona apresenta tautomerismo cetoenólico, e sua forma enólica possui uma hidroxila de natureza ácida. As reações de dissociação destes compostos podem ser visualizadas na Figura 13.

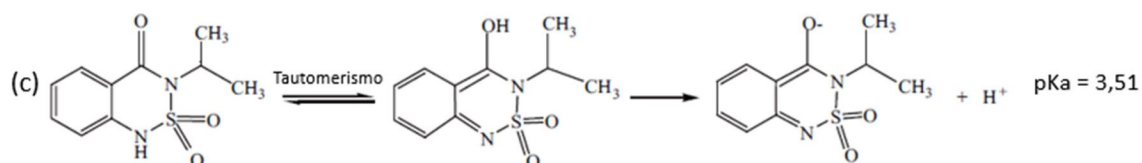
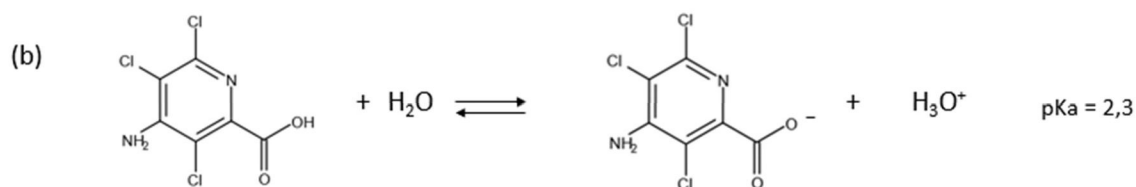
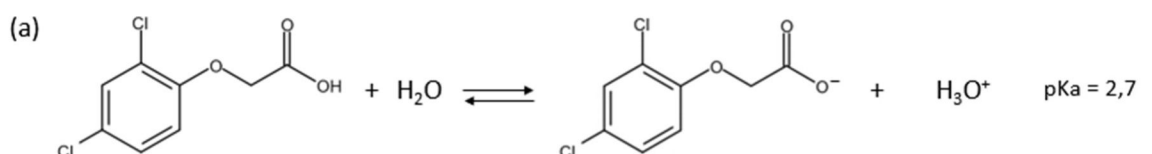
TABELA 9 – COMPARAÇÃO ENTRE HF-LPME EM 3 FASES E HF $\mu$ E

|               | GRUPO A     |                 |              |                 | GRUPO B           |             |                 |              |                 |
|---------------|-------------|-----------------|--------------|-----------------|-------------------|-------------|-----------------|--------------|-----------------|
|               | pH FD ácido |                 | pH FD básico |                 |                   | pH FD ácido |                 | pH FD básico |                 |
|               | HF $\mu$ E  | HF-LPME 3 fases | HF $\mu$ E   | HF-LPME 3 fases |                   | HF $\mu$ E  | HF-LPME 3 fases | HF $\mu$ E   | HF-LPME 3 fases |
| 2,4-D         | ✓           | ✓               |              |                 | Alaclor           | ✓           |                 | ✓            |                 |
| Aldicarbe     |             |                 |              |                 | Aletrina          | ✓           |                 |              |                 |
| Ametrina      |             |                 |              |                 | Brodifacum        |             |                 | ✓            |                 |
| Atrazina      | ✓           |                 | ✓            |                 | Bromadiolona      |             |                 |              |                 |
| Bendiocarbe   | ✓           |                 |              |                 | Clorimurom etil   | ✓           | ✓               |              |                 |
| Bentazona     |             | ✓               |              |                 | Clorpirifós       | ✓           |                 |              |                 |
| Carbaril      | ✓           |                 |              |                 | Clorpirifós-metil | ✓           |                 |              |                 |
| Diurum        | ✓           |                 | ✓            |                 | Cumatetralil      | ✓           | ✓               |              |                 |
| Imidacloprida |             |                 |              |                 | Diazinon          | ✓           |                 | ✓            |                 |
| Linurom       | ✓           |                 |              |                 | Difacinona        |             |                 |              |                 |
| Metomil       |             |                 |              |                 | Difenacum         |             |                 | ✓            |                 |
| Picloram      |             | ✓               |              |                 | Dissulfotom       | ✓           |                 |              |                 |
| Pirimicarbe   |             |                 |              | ✓               | Oxifluorfem       | ✓           |                 | ✓            |                 |
| Propoxur      |             |                 |              |                 | Terbufós          |             |                 |              |                 |

HF-LPME: microextração em fase líquida suportada com fibra oca; HF $\mu$ E: microextração em fibra oca; FD: fase doadora.

✓: analitos que foram extraídos em termos de presença de picos cromatográficos

FIGURA 13: REAÇÕES DE DISSOCIAÇÃO DOS COMPOSTOS 2,4-D (a), PICLORAM (b) E BENTAZONA (c).



FONTES: (a) e (b): A AUTORA, (c): Adaptado de LIU et al., 2011. DADOS DE pKa: PubChem Database

Os compostos 2,4-D picloram e a bentazona possuem valores de pKa iguais, respectivamente, a 2,7, 2,3 e 3,51. Assim, com a adição de HCl 0,1 M (pH=1), estes compostos encontram-se predominantemente na forma molecular, facilitando sua difusão pelo solvente extrator impregnado na fibra até o seu lúmen. Uma vez no lúmen, preenchido com solução de hidróxido de sódio 0,1 M (pH=13), os compostos se ionizam, o que diminui sua solubilidade no solvente orgânico, aprisionando-os no interior da fibra.

Já a técnica de extração por HF-LPME em 3 fases com fase doadora básica e fase acceptora ácida foi eficiente na extração do composto pirimicarbe. O pirimicarbe possui natureza básica e pKa igual a 4,5. Assim, sua extração ocorre da fase doadora em meio básico, em que se encontra predominantemente na forma molecular, para a fase acceptora com pH ácido, em que é protonado mantendo-se no interior da fibra.

No grupo B, os únicos compostos extraídos pela HF-LPME em 3 fases foram o clorimuram etil e o cumatetralil, os quais possuem natureza ácida e valores de pKa iguais a 4,2 e 4,5, respectivamente. Assim, foram extraídos no sistema com fase doadora ácida e acceptora básica. Como os compostos inclusos no grupo B são os mais apolares, era esperado que a extração pelo 1-octanol (como na HF-LPME em 2 fases e na HF $\mu$ E) fosse mais eficiente.

Como a extração por HF $\mu$ E foi capaz de extrair um maior número de analitos frente à HF-LPME tanto em 2 quanto em 3 fases, ela foi selecionada para os demais ensaios. Além do mais, sua facilidade de execução demonstra-se uma vantagem em relação à HF-LPME, principalmente para aplicação em uma rotina que necessite de maior frequência analítica. Cabe ressaltar porém o sucesso da HF-LPME em 3 fases na extração de compostos polares, frente à LLE e à HF $\mu$ E. Tal fato não é determinante em uma triagem que deve ser ampla incluindo o maior número de compostos possíveis, mas seu uso em associação com outras técnicas pode ser de grande auxílio.

### 4.3 HF $\mu$ E

#### 4.3.1 Seleção do solvente de dessorção para a HF $\mu$ E

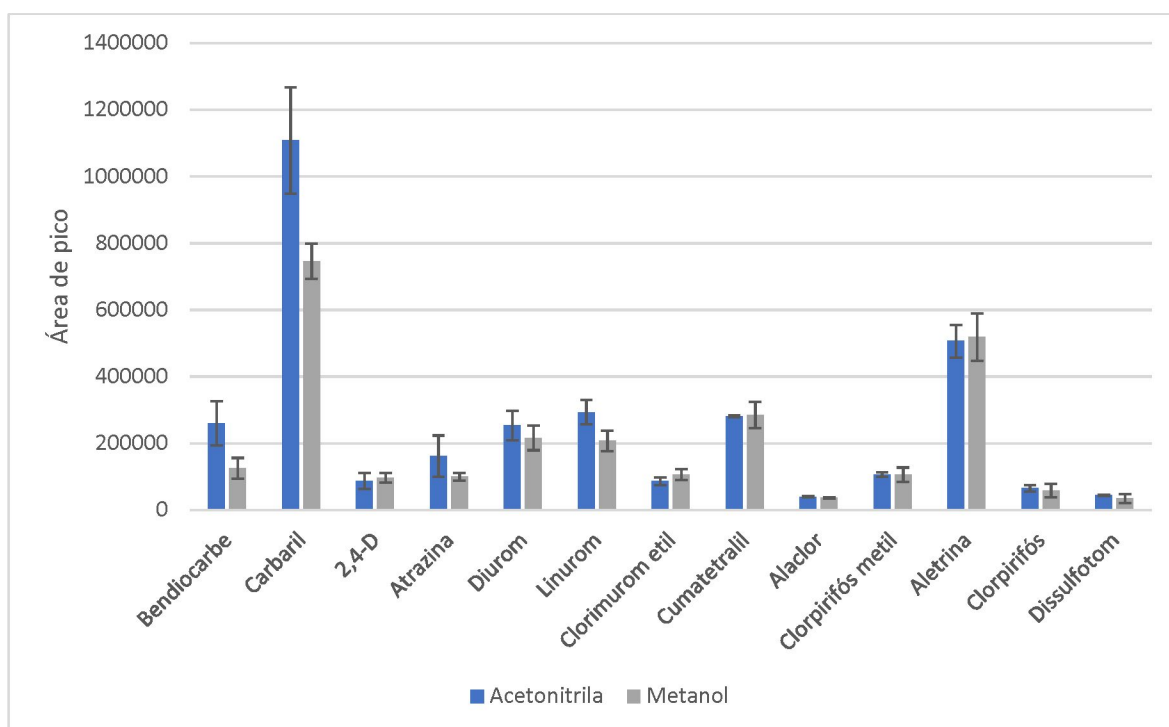
A HF $\mu$ E, diferentemente da HF-LPME, é acrescida de uma etapa de dessorção posterior à extração. Nos trabalhos prévios utilizando esta técnica (IDE; NOGUEIRA, 2018, 2019a), a etapa de dessorção tem sido realizada utilizando-se o mesmo solvente utilizado para a extração. Tal fato era possível já que as análises foram realizadas via cromatografia

gasosa. Como no caso da cromatografia líquida, o uso do 1-octanol seria incompatível com o sistema, foi necessária a avaliação de solventes compatíveis para a dessorção, sem a necessidade de etapa de secagem do solvente e reconstituição em fase móvel.

Foram avaliados dois solventes, metanol e acetonitrila. Nesta etapa, foi realizada a extração nas condições já estabelecidas para os primeiros ensaios (pH da fase doadora ácido, 600 rpm, 30 min) e a dessorção através da imersão da fibra em um vial contendo 100  $\mu$ L do solvente, e posterior agitação em ultrassom por 5 minutos a temperatura ambiente (triplicata para cada um dos solventes analisados). Foi avaliada a eficiência da dessorção, através das áreas de pico obtidas, e o impacto do solvente na pressão do sistema cromatográfico.

Quanto à eficiência da dessorção, foi observado que a dessorção em acetonitrila resultou em maiores áreas de pico para alguns analitos e muito próxima à do metanol nos demais (Figura 14). O uso de metanol, devido à sua maior viscosidade, causou um aumento na pressão do sistema, o que não ocorreu com o uso de acetonitrila. Soma-se a isso, ainda, o fato de que a acetonitrila não absorve na região do ultravioleta na faixa de trabalho e é um constituinte da fase móvel utilizada, não acarretando, desta maneira, variações de composição da fase móvel durante a corrida cromatográfica. Assim, a acetonitrila foi selecionada para realizar a dessorção dos analitos da fibra.

FIGURA 14: GRÁFICO DE COMPARAÇÃO DAS ÁREAS DE PICO RESULTANTES DA DESSORÇÃO COM ACETONITRILA E METANOL PARA A HF $\mu$ E



FONTE: A AUTORA

#### 4.3.2 Avaliação de solventes orgânicos

Para os ensaios iniciais, o 1-octanol foi escolhido como fase extratora por já ser um solvente amplamente utilizado na literatura com bons resultados, além da experiência prévia dentro do grupo de pesquisa com este solvente. O 1-octanol apresentou bom desempenho, sendo capaz de extrair diversos analitos, conforme demonstrado anteriormente nas Tabelas 6 e 7. Além do mais, o 1-octanol apresentou repetibilidade na recuperação dos analitos e não causou interferência no cromatograma.

Por outro lado, em seu trabalho, Ide e Nogueira abriram a possibilidade do uso de mais de uma fibra simultaneamente, cada uma impregnada com um solvente diferente (IDE; NOGUEIRA, 2019a). Assim, com o uso de solventes de polaridades distintas em um mesmo processo de extração, é possível ampliar a faixa de polaridade dos analitos extraídos. Como, no caso de uma triagem toxicológica, o objetivo está em extrair um maior número de compostos possível e os analitos selecionados encontram-se em uma ampla faixa de polaridade, com valores de log P situando-se entre o -1,92 (picloram) e 7,6 (difenacum), foram avaliados outros solventes para verificar a possibilidade de uso de mais de uma fibra com solventes diferentes. Os solventes avaliados, bem como algumas de suas propriedades físico-químicas de interesse estão listadas na Tabela 10.

TABELA 10 – SOLVENTES AVALIADOS PARA USO EM HF<sub>μ</sub>E E SUAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

| <b>Solvente</b>   | <b>log P</b> | <b>Pressão de vapor<br/>(mm Hg a 25°C)</b> |
|-------------------|--------------|--|
| Acetato de butila | 1,78         | 11,5                                       |
| Acetato de etila  | 0,73         | 93,2                                       |
| Clorofórmio       | 1,97         | 197  |
| Diclorometano     | 1,25         | 435  |
| Hexano            | 3,9          | 153  |
| Tolueno           | 2,73         | 28,4                                       |

FONTE: PubChem Database

Dentre os solventes avaliados, o diclorometano e o hexano, devido à sua alta pressão de vapor e conseqüente volatilidade, possivelmente evaporaram durante a extração. Em ambos os casos as fibras foram retiradas da fase doadora aparentemente secas e não foi observado nenhum analito na corrida cromatográfica.

Os demais solventes, apesar de diferentes polaridades, não foram capazes de extrair nenhum analito além dos já previamente extraídos pelo 1-octanol, de modo que seguiu-se

apenas com esse solvente. Além disso, o uso de tolueno acarretou na coeluição deste solvente com o composto cumatetralil na análise com fase móvel B.

#### 4.3.3 Avaliação do pH da fase doadora

Dentre os analitos selecionados, há substâncias tanto de caráter ácido quanto de caráter básico, dentro de uma ampla faixa de pKa (Tabela 3). Assim foram avaliadas fases doadoras com tampão nos pHs 3, 4, 5, 6 e 7 para determinar a condição que extraísse o maior número de compostos possível dentre os analisados, já que, à exceção do bendiocarbe e do carbaril, todos os demais analitos possuem valores de pKa dentro dessa faixa. Os resultados obtidos, em relação a analitos extraídos, podem ser visualizados na Tabela 11.

TABELA 11 – ANALITOS EXTRAÍDOS POR HF<sub>μ</sub>E DE ACORDO COM O pH

| GRUPO A       |   |   |   |   |   | GRUPO B           |   |   |   |   |   |
|---------------|---|---|---|---|---|-------------------|---|---|---|---|---|
| pH            | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | pH                | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 2,4-D         | ✓ |   |   |   |   | Alaclor           | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Aldicarbe     |   |   |   |   |   | Aletrina          | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Ametrina      | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | Brodifacum        |   |   |   | ✓ | ✓ |
| Atrazina      | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | Bromadiolona      |   |   |   |   |   |
| Bendiocarbe   | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | Clorimurum etil   | ✓ | ✓ | ✓ |   |   |
| Bentazona     |   |   |   |   |   | Clorpirifós       | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Carbaril      | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | Clorpirifós-metil | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Diurum        | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | Cumatetralil      | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |   |
| Imidacloprida |   |   |   |   |   | Diazinon          | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Linurom       | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | Difacinona        |   |   |   |   |   |
| Metomil       |   |   |   |   |   | Difenacum         |   |   |   | ✓ | ✓ |
| Picloram      |   |   |   |   |   | Dissulfotom       | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Pirimicarbe   |   |   |   |   |   | Oxifluorfem       |   |   |   | ✓ | ✓ |
| Propoxur      |   |   |   |   |   | Terbufós          | ✓ | ✓ |   |   |   |

✓: analitos que foram extraídos

No grupo A, a variação do pH afetou pouco o resultado em termos de número de analitos detectados. O 2,4-D foi o único analito que foi detectado apenas em pH 3. Conforme discutido anteriormente, o 2,4-D é um composto de natureza ácida bastante polar. Demais analitos com estas características (bentazona e picloram) foram extraídos apenas no sistema HF-LPME em 3 fases, que se mostrou o mais adequado nessa situação.

Dentre os analitos do grupo A, não foram extraídos por nenhuma das técnicas de microextração com fibra oca avaliadas os compostos aldicarbe, metomil, propoxur e

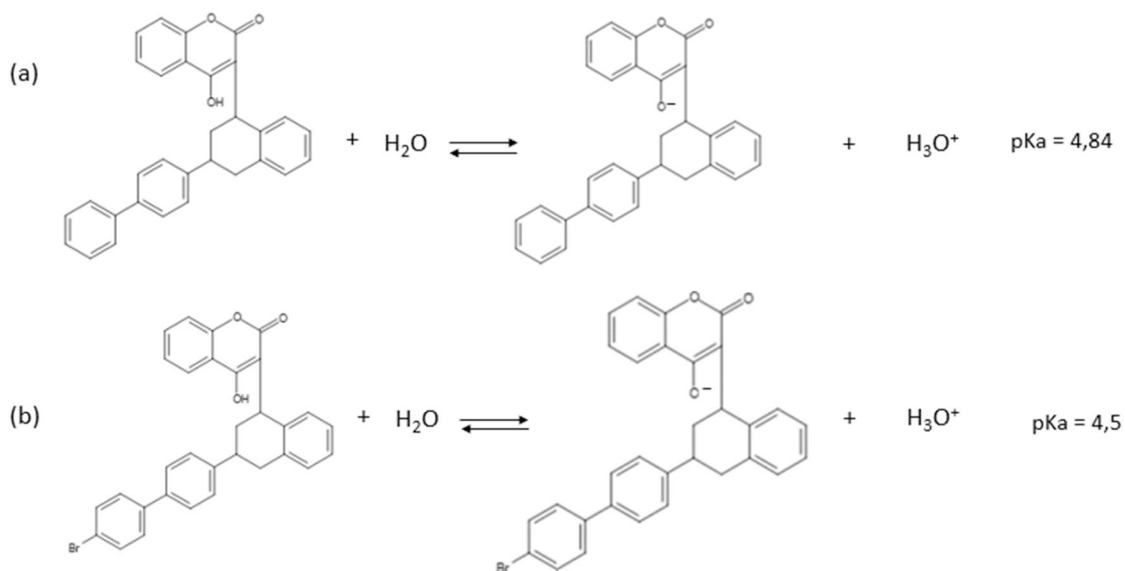
imidacloprida. Segundo a literatura, estes compostos não se dissociam, então não há influência do pH da fase doadora na sua extração. Todos são compostos polares, com valores de log P entre 0,09 e 1,15 (Tabela 3), o que justifica sua extração com boa eficiência em um solvente mais polar como o diclorometano usado na extração líquido-líquido (log P = 1,25), em detrimento à microextração com fibra oca utilizando 1-octanol.

No grupo B, sofreram influência do pH os compostos clorimurum etil, cumatetralil, brodifacum, difenacum, terbufós e oxifluorfem.

Os compostos clorimurum etil e cumatetralil são compostos de natureza ácida, com valores de pKa, respectivamente, iguais a 4,2 e 4,5. Desta forma, os analitos se encontram predominantemente na forma molecular em pHs abaixo desses valores, o que justifica sua extração em condições de pHs mais baixos.

Em compensação, o comportamento dos analitos difenacum e brodifacum não seguiu o esperado. Ambos também são compostos de natureza ácida, com valores de pKa iguais a 4,84 e 4,5, respectivamente. Assim, espera-se que tais analitos sejam melhor extraídos em pHs abaixo desses valores de pKa, em que se encontram na forma não ionizada (Figura 15).

FIGURA 15: REAÇÕES DE DISSOCIAÇÃO DOS COMPOSTOS DIFENACUM (a) E BRODIFACUM (b).

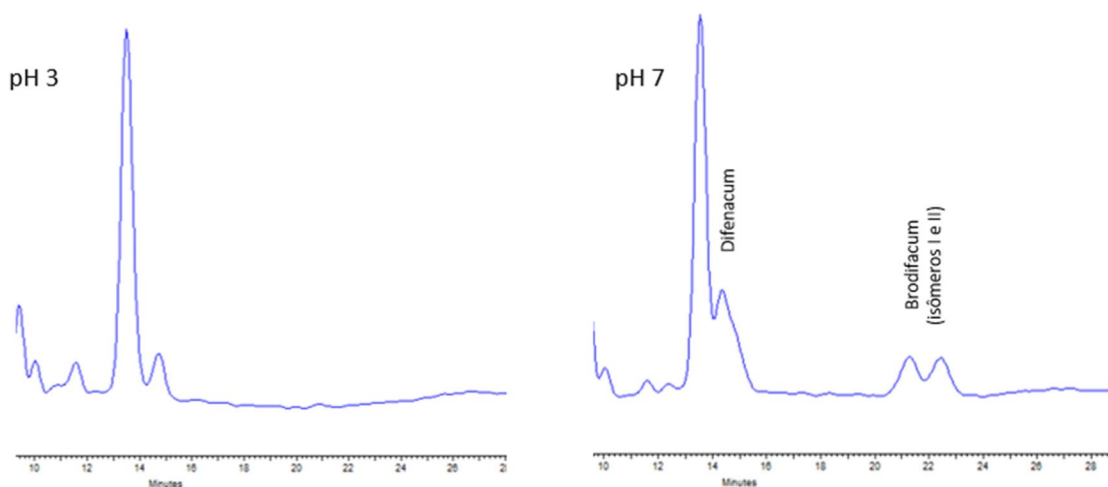


FONTE: A AUTORA. DADOS DE pKa: PubChem Database

Porém, na prática, foi observado o contrário, já que os analitos foram detectados apenas nas extrações realizadas em pH 6 e 7. Foram detectados também na extração utilizando hidróxido de sódio na composição da fase doadora (Tabela 9). Dentre os analitos

incluídos no estudo, o difenacum e o brodifacum são os compostos mais apolares, com valores de logP iguais, respectivamente, a 7,6 e 6,12. Estes valores são obtidos em pH 7, acima do valor de pKa dos compostos, ou seja, em uma condição em que os mesmos se encontram parcialmente ionizados. Espera-se que em pHs menores, com predominância da forma molecular dos compostos, sua solubilidade no 1-octanol seja ainda maior. Levando-se isso em consideração, é possível esperar que, mesmo ionizados, os analitos sejam extraídos devido à sua alta afinidade pelo 1-octanol impregnado na fibra. Porém, em pHs mais baixos, é possível que os compostos na forma molecular, com afinidade ainda maior pelo solvente extrator fiquem retidos no solvente impregnado na fibra, impedindo sua dessorção para a acetonitrila. A dessorção acaba sendo facilitada em pHs mais altos, em que os compostos, predominantemente na forma ionizada, se tornam menos apolares, aumentando sua solubilidade na acetonitrila. Assim, por serem melhor dessorvidos para a acetonitrila em pHs mais elevados, nestes que são detectados (Figura 16).

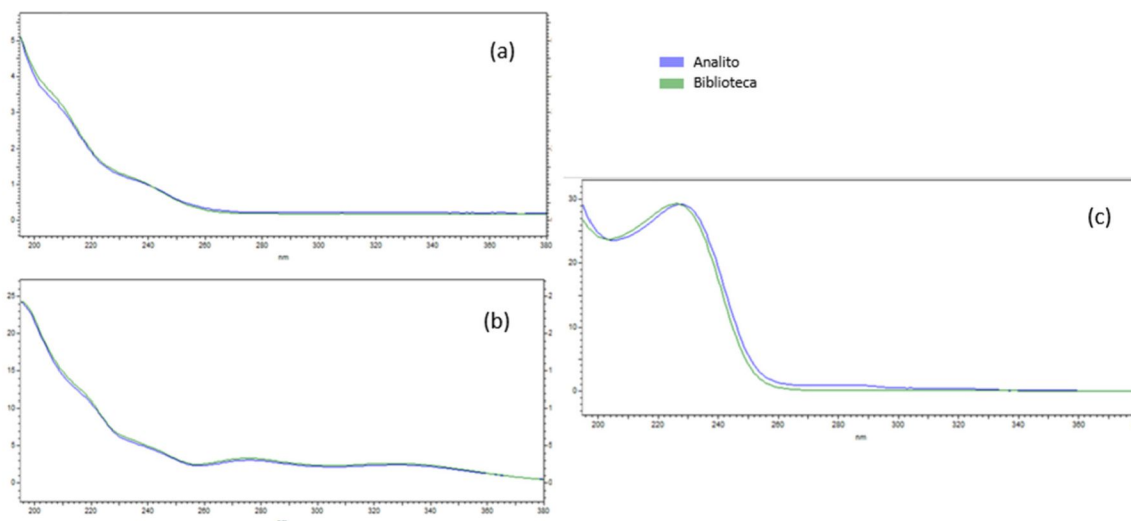
FIGURA 16 – BRODIFACUM E DIFENACUM NOS pHs 3 E 7



FONTE: A AUTORA

No caso dos compostos oxifluorfem e terbufós que, segundo a literatura, são compostos que não se dissociam, era de se esperar que os compostos pudessem ser detectados independentemente do pH da fase doadora. Tais compostos, porém coeluíram com a aletrina, o que pode ter prejudicado sua visualização em algumas corridas. Nas análises em que foram detectados, a detecção foi possível também graças aos espectros de DAD e comparação com a biblioteca (Figura 17).

FIGURA 17 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DOS ANALITOS TERBUFÓS (a), OXIFLUORFEM (b) E ALETRINA (c) COM A BIBLIOTECA



FONTE: A AUTORA

Em resumo, com os ensaios realizados foi possível verificar vantagens e limitações da aplicação de técnicas de microextração com fibra oca em detrimento da extração líquido-líquido clássica em uma triagem toxicológica.

Apesar de algumas dificuldades relacionadas à coeluição na interpretação de dados de alguns compostos, já que não foi foco do trabalho nesse momento ajustar as condições cromatográficas, foi possível observar que, de modo geral, as técnicas de microextração apresentaram dificuldade na extração de compostos de maior polaridade. Tal fato poderia ser contornado através do uso de mais uma fibra impregnada com um solvente diferente do 1-octanol, porém nenhum dos solventes testados neste estudo alcançaram sucesso nesse objetivo. Com a necessidade de inclusão, em uma triagem toxicológica, de uma ampla gama de analitos de diversas polaridades, esse fator pesa contra as técnicas de microextração aqui avaliadas.

As técnicas de microextração com fibra oca, porém, apresentam vantagens em comparação com a extração líquido-líquido, como a seletividade e reduzido volume de solventes orgânicos. Com base nos resultados obtidos, é possível selecionar para a próxima etapa do projeto os compostos que responderam bem às técnicas avaliadas para criar um método confirmatório quantitativo para uma gama delimitada de analitos utilizando a microextração com fibra oca (HF $\mu$ E), em consonância com as diretrizes dentro do campo da Toxicologia Forense, que recomendam a realização de uma segunda análise após a triagem para maior confiabilidade dos resultados obtidos.

## 4.4 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO CONFIRMATÓRIO POR GC/MS

### 4.4.1 Seleção dos compostos de interesse

Devido à importância, dentro da Toxicologia Forense, de, sempre que possível, se realizar uma análise confirmatória por um método que apresente princípio físico ou químico diferente do método usado na triagem, foram selecionados analitos para o desenvolvimento de um método confirmatório utilizando a técnica de Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas (GC/MS). Para tanto, foram escolhidos analitos que responderam bem às extrações iniciais, excluindo-se analitos que, sabidamente, não são passíveis de serem analisados por GC/MS sem a necessidade de uma etapa prévia de derivatização, como os carbamatos e os cumarínicos.

Os compostos previamente selecionados para esta etapa foram os inseticidas organofosforados clorpirifós, clorpirifós-metil, diazinon, dissulfotom e terbufós, além dos herbicidas alacloro, clorimuron etil, diurom, linurom, ametrina e atrazina (Figura 18).

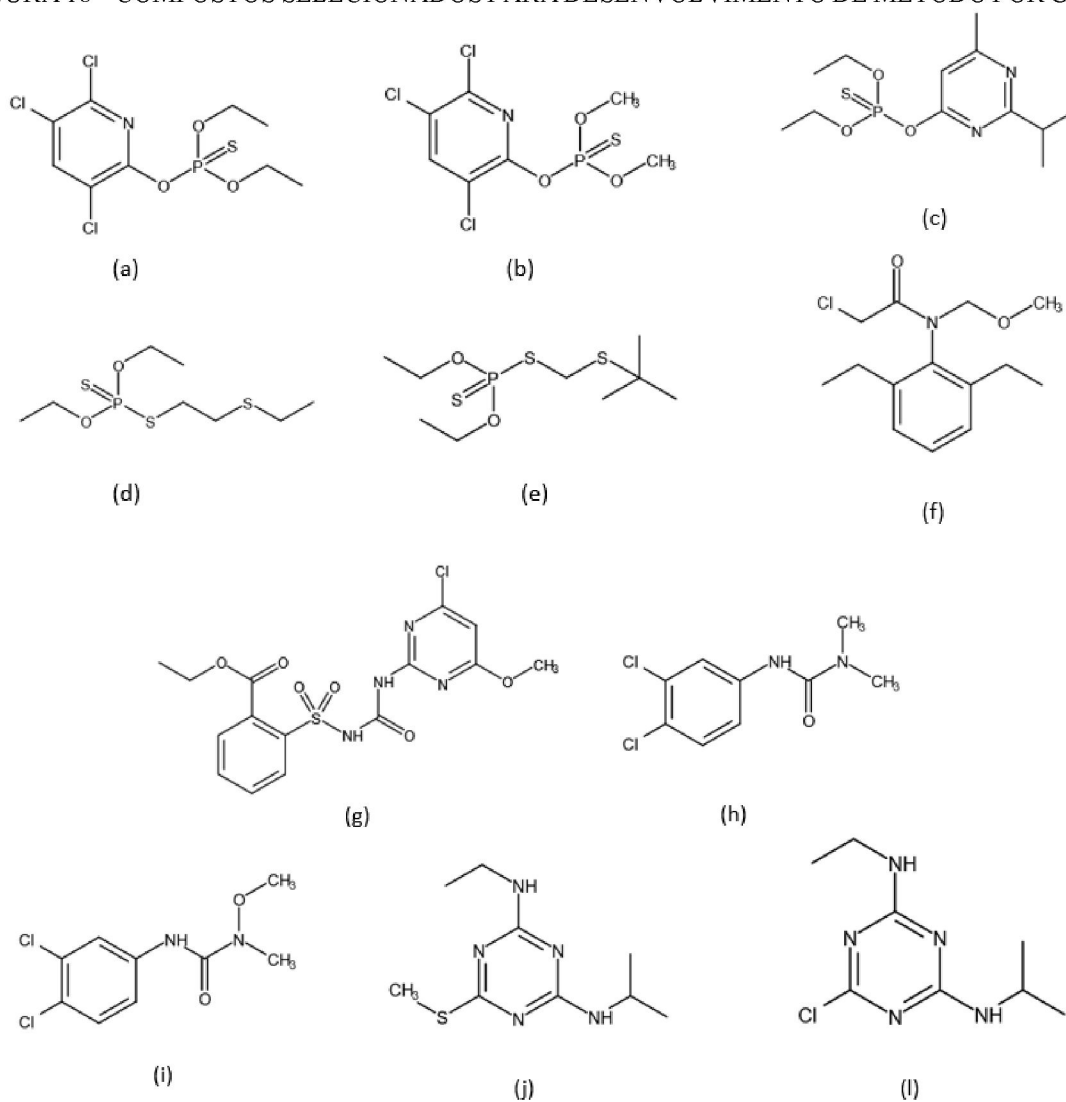
Inicialmente, um mix dos compostos selecionados foi analisado para verificar se os mesmos são passíveis de serem analisados pela técnica de cromatografia em fase gasosa. Nesta etapa, os espectros de massa foram obtidos em modo *full scan*, sendo realizada a varredura na faixa de  $m/z$  de 60 a 450.

O cromatograma obtido pode ser visualizado na Figura 19. A identificação dos compostos foi realizada através da comparação do espectro de massas obtido com a biblioteca de referência.

Dentre os compostos previamente selecionados, não foi possível a detecção do diurom e do clorimurom etil.

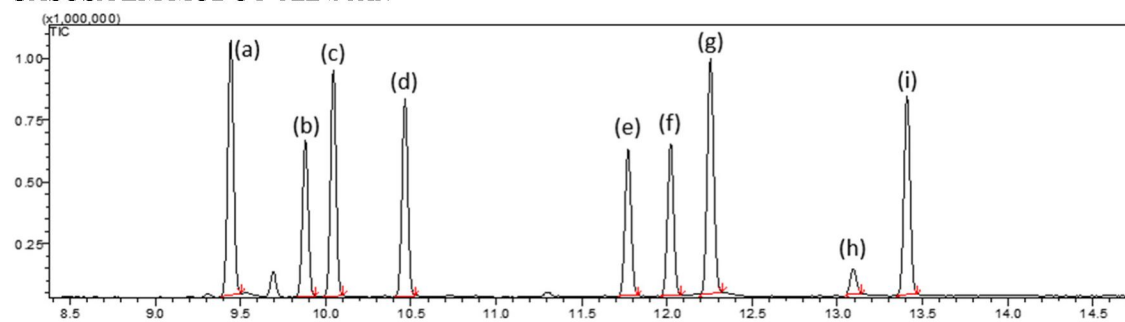
O diurom é um herbicida da classe fenilureia. De acordo com a literatura, esta classe de compostos é instável termicamente e, em sua maioria, se degradam quando analisados por cromatografia gasosa. Diversos fatores durante a análise podem influenciar na reação de degradação, como a temperatura de injeção, o solvente utilizado e o modo de injeção. (CRESPO-CORRAL, 2008; PEÑA et al, 2002) A principal reação envolvida no processo é a decomposição da fenilureia resultando em um isocianato aromático e uma amina alifática (Figura 20).

FIGURA 18 – COMPOSTOS SELECIONADOS PARA DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR GC/MS



a) clorpirifós; b) clorpirifós metil; c) diazinon; d) dissulfotom; e) terbufós; f) alacloro; g) clorimurom etil; h) diurom; i) linurom; j) ametrina; l) atrazina.

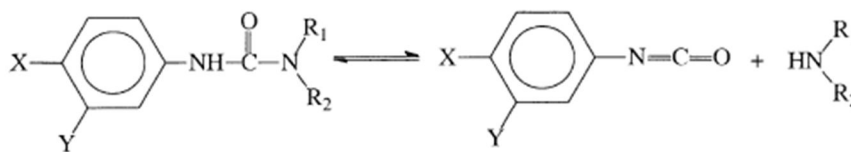
FONTE: CAS Common Chemistry

FIGURA 19 – CROMATOGRAMA OBTIDO APÓS ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA EM MODO *FULL SCAN*

(a): atrazina; (b): terbufós; (c): diazinon; (d): dissulfotom; (e) clorpirifós metil; (f): alaclor; (g): ametrina; (h): linurom; (i): clorpirifós

FONTE: A AUTORA

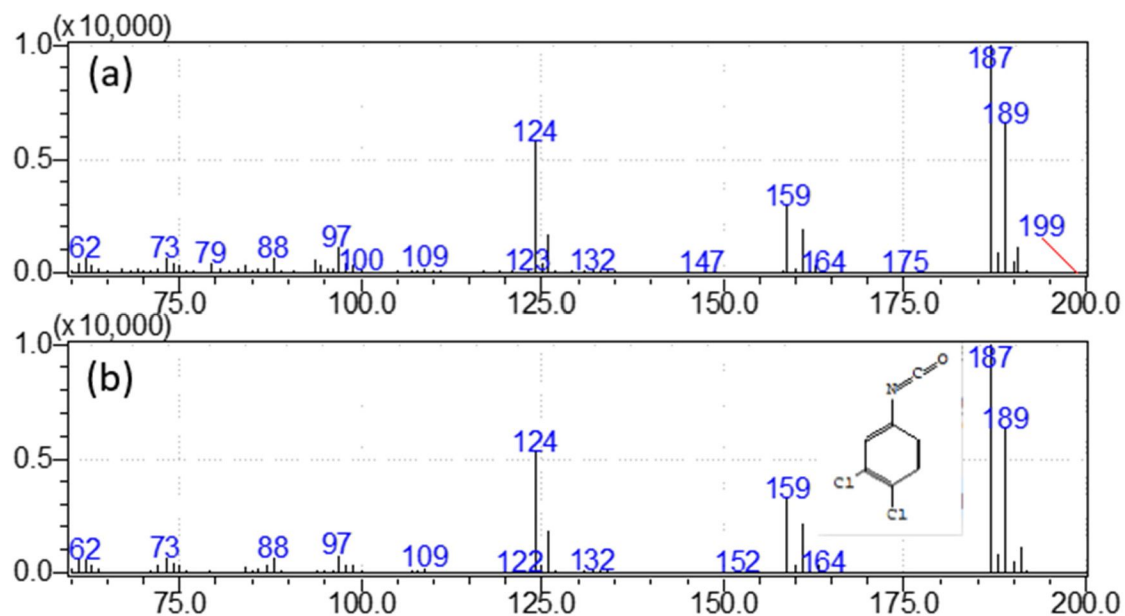
FIGURA 20 – REAÇÃO DE DECOMPOSIÇÃO DOS HERBICIDAS FENILUREIA



FONTE: GENNARO, 2001

Foi possível observar, no cromatograma obtido, um pico cromatográfico cujo espectro é compatível com o isocianato derivado do diurom de acordo com a biblioteca de espectros, com similaridade igual a 96% (Figura 21). Ainda segundo a literatura, a mesma reação ocorre com o linurom, herbicida fenilureia de estrutura similar à do diurom (Figura 18), originando o mesmo produto de degradação (PEÑA, 2002). O mesmo pico foi detectado quando analisados os padrões de diurom e linurom isoladamente, confirmando que os dois compostos estavam sofrendo degradação durante a análise. Assim estes compostos foram excluídos das etapas seguintes, para evitar etapa adicional de derivatização.

FIGURA 21: COMPARAÇÃO DO ESPECTRO DE MASSAS DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO DO DIUROM COM A BIBLIOTECA



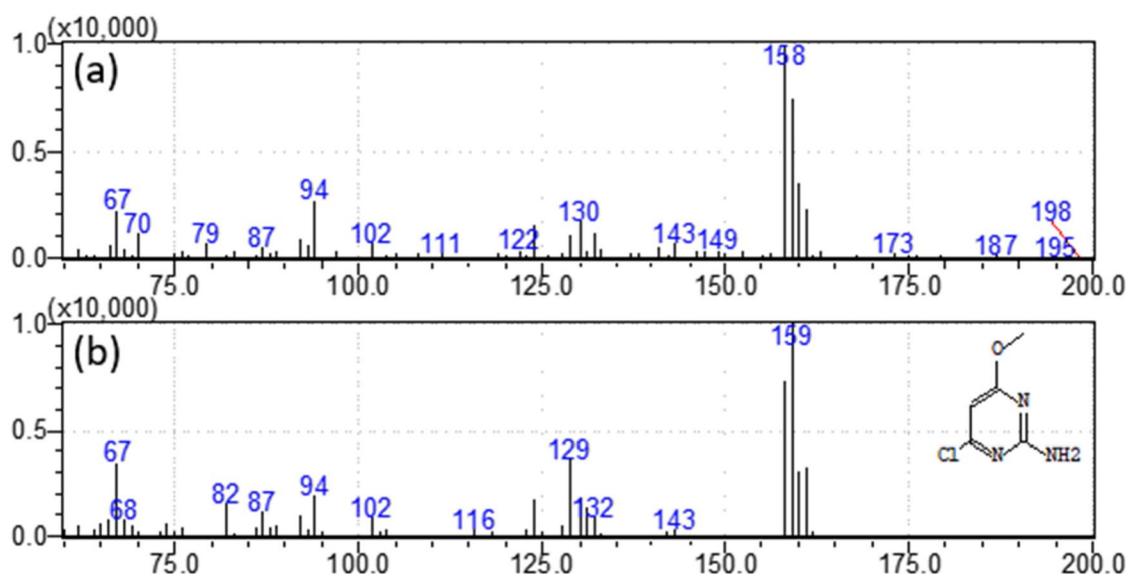
(a) Espectro de massas obtido; (b) espectro de massas correspondente na biblioteca

FONTE: A AUTORA

O clorimurom etil é um herbicida pertencente a outra classe de ureias substituídas, as sulfonilureias, que também são instáveis termicamente. O clorimurom etil (Figura 18g), quando analisado por cromatografia em fase gasosa com ionização por impacto de elétrons

pode gerar como produtos de degradação o isocianato do anel heterocíclico e a amina heterocíclica correspondentes (GALLETTI et al., 1991). No cromatograma obtido, foi possível observar um pico compatível com a amina heterocíclica de acordo com a biblioteca de espectros, com similaridade igual a 89% (Figura 22). Este composto também foi excluído das etapas seguintes.

FIGURA 22: COMPARAÇÃO DO ESPECTRO ED MASSAS DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO DO CLORIMUROM ETIL COM A BIBLIOTECA



(a) Espectro de massas obtido; (b) espectro de massas correspondente na biblioteca  
 FONTE: A AUTORA

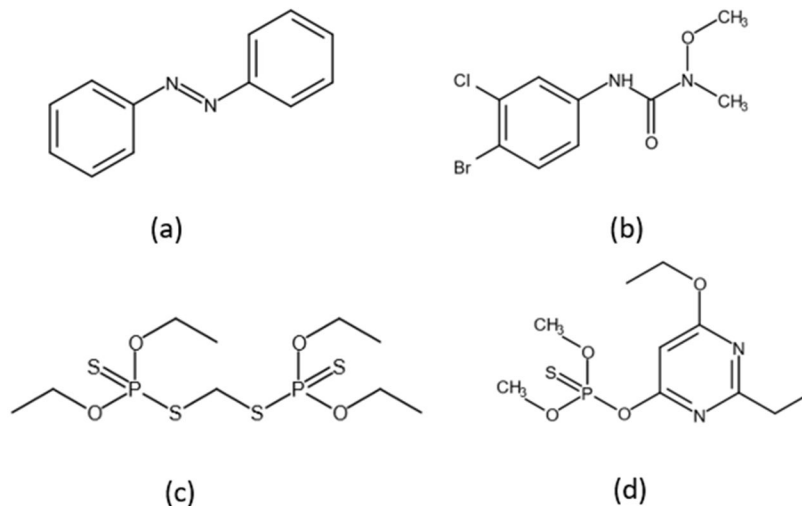
#### 4.4.2 Seleção do padrão interno

Para seleção do padrão interno, foram avaliados quatro compostos: azobenzeno clorbromurom, etiona e etrinfós (Figura 23). Os compostos foram selecionados de acordo com a disponibilidade de padrão analítico e por serem inseticidas de uso proibido no Brasil pela ANVISA, o que torna pouco provável a sua presença em amostras reais provenientes de casos suspeitos de intoxicação.

Os compostos foram analisados nas mesmas condições cromatográficas que os analitos (Figura 24). O clorbromurom não foi detectado nas condições utilizadas. Dentre os demais candidatos, foi possível observar que o azobenzeno eluiu cerca de dois minutos antes do primeiro analito, enquanto o etion cerca de quatro minutos após o último. Assim, foi selecionado o etrinfós, que apresentou tempo de retenção mais próximo aos analitos. O

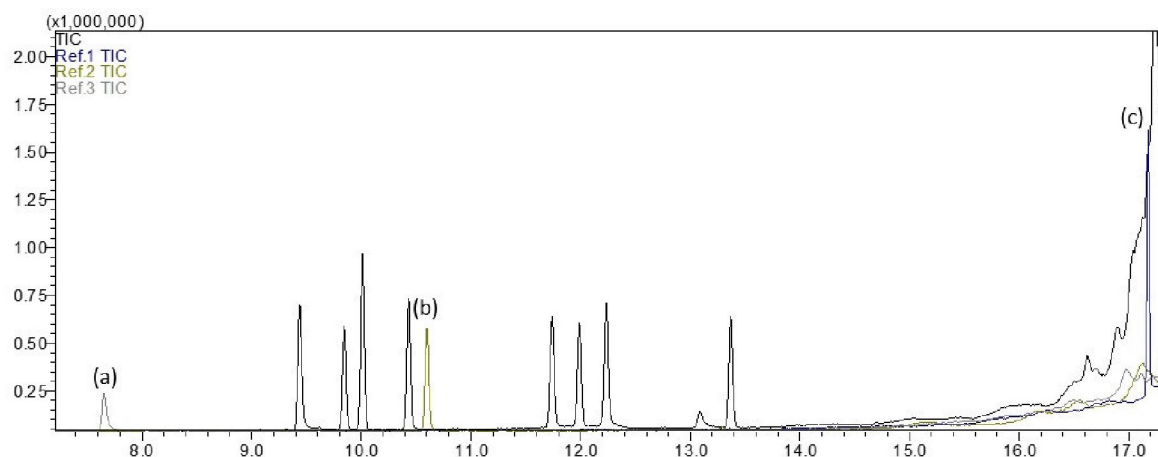
etrinfós apresenta valor de log P igual a 2,94, intermediário entre os analitos, não se ioniza, e é passível de ser extraído nas mesmas condições que os analitos.

FIGURA 23 – COMPOSTOS AVALIADOS COMO PADRÃO INTERNO



a) Azobenzeno; b) Clorbromurom; c) Etiona; d) Etrinfós  
 FONTE: CAS Common Chemistry

FIGURA 24 – CROMATOGRAMAS DOS ANALITOS E CANDIDATOS A PADRÃO INTERNO

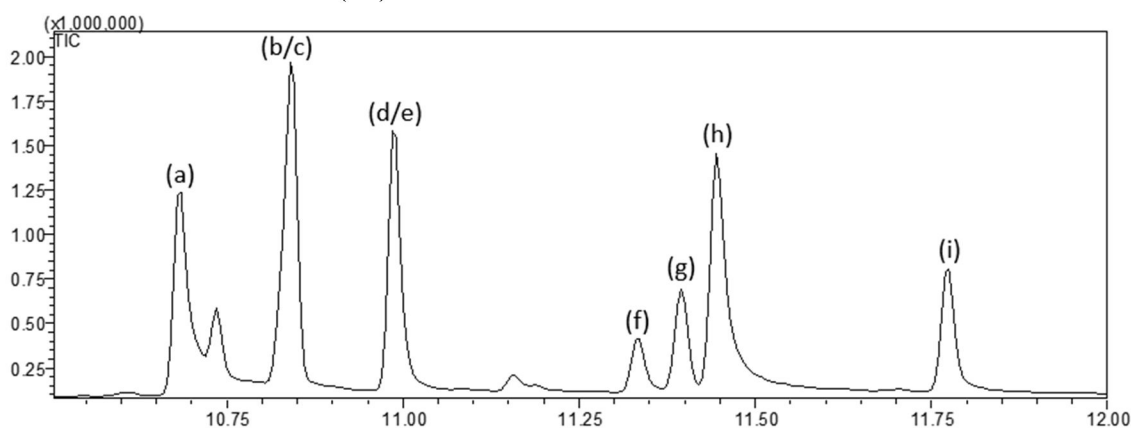


(a) Azobenzeno; (b) Etrinfós; (c) Etiona.  
 FONTE: A AUTORA

#### 4.4.3 Condições cromatográficas

Nas condições cromatográficas estabelecidas (Seção 3.3 – Tabela 4), houve a co-eluição entre os compostos terbufós e diazinon (Figura 25 – b/c) e dissulfotom e etrinfós (d/e), quando realizada análise no modo *Full Scan*.

FIGURA 25 – CO-ELUIÇÃO ENTRE OS COMPOSTOS TERBUFÓS E DIAZINON (b/c) E DISSULFOTOM E ETRINFÓS (d/e)

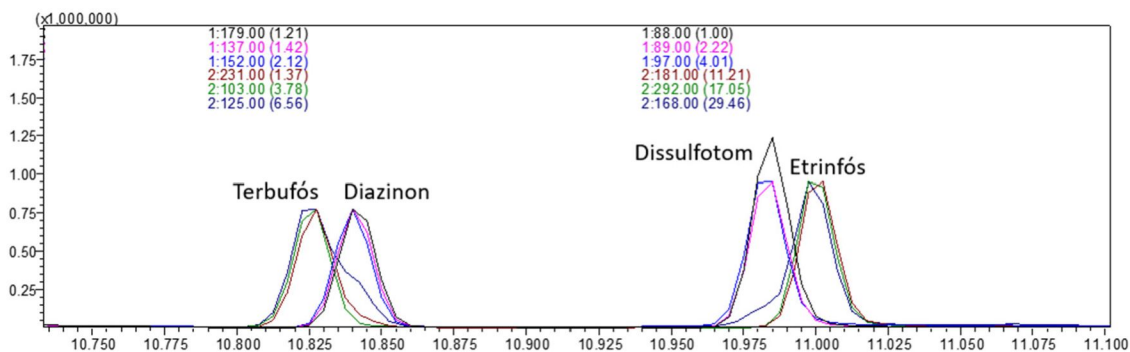


(a) Atrazina; (b) Terbufós; (c) Diazinon; (d) Dissulfotom; (e) Etrinfós; (f) Clorpirifós metil; (g) Alaclor; (h) Ametrina; (i) Clorpirifós.

FONTE: A AUTORA

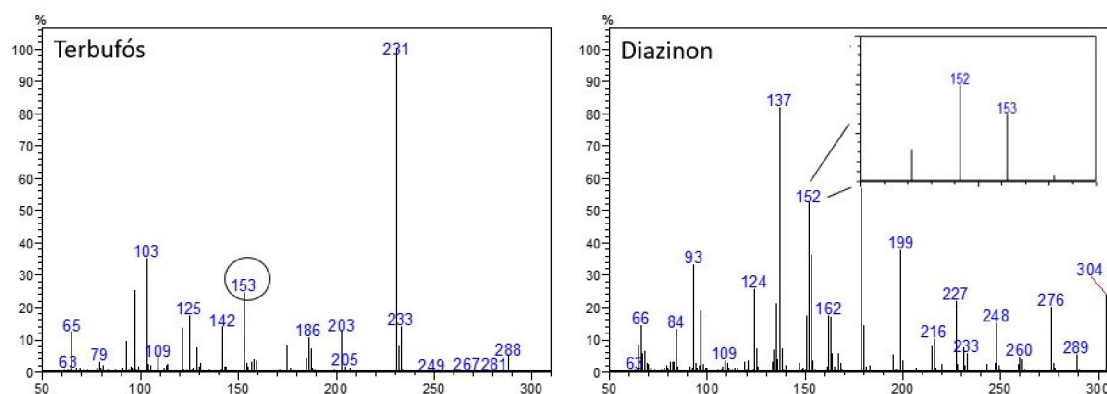
Porém, foi possível atingir a separação entre os analitos através do método de Monitoramento Seletivo de Íons (*Selected Ion Monitoring* – SIM), conforme demonstrado na Figura 26. Nesta análise, foram selecionados os íons  $m/z$  231, 103 e 125 para o terbufós; 179, 137 e 152 para o diazinon; 88, 89 e 97 para o dissulfotom; e 181, 292 e 168 para o etrinfós. Para a escolha dos íons, foram selecionados íons que possuíssem alta abundância no espectro de massas destes compostos, mas que não estivessem presentes no espectro de massas do composto que co-elui no método *Full Scan*. Por exemplo, no caso do terbufós, o íon  $m/z$  153 é o terceiro mais abundante no espectro de massas (Figura 27) e normalmente seria escolhido como um dos íons de confirmação. Porém, como este íon também está presente no espectro do diazinon, o mesmo foi substituído pelo íon  $m/z$  125.

FIGURA 26 – SEPARAÇÃO ENTRE OS COMPOSTOS TERBUFÓS E DIAZINON, E DISSULFOTOM E ETRINFÓS ATRAVÉS DO MÉTODO SIM



FONTE: A AUTORA

FIGURA 27 – ESPECTROS DE MASSAS DOS COMPOSTOS TERBUFÓS E DIAZINON



FONTE: A AUTORA

Para todos os demais compostos, foram também selecionados 3 íons, sendo um deles o íon de quantificação, e outros dois íons de confirmação, à exceção do clorpirifós metil. Devido a interferências observadas nos íons avaliados, foi estabelecido apenas um íon de confirmação neste caso.

De maneira geral, foi escolhido o íon mais abundante do espectro como íon de quantificação, à exceção do clorpirifós. No espectro de massas do clorpirifós, o íon mais abundante é o  $m/z$  97, porém deu-se preferência ao íon  $m/z$  197, que também apresenta alta abundância e, por possuir uma massa mais elevada, é mais seletivo. Os íons selecionados para cada composto, bem como seus tempos de retenção, estão expressos na Tabela 12.

TABELA 12 – PARÂMETROS DE IDENTIFICAÇÃO DOS ANALITOS

| Composto          | $T_R$ (min) | Íon de Quantificação | Íons de Confirmação |
|-------------------|-------------|----------------------|---------------------|
| Atrazina          | 10,670      | 200                  | 215, 173            |
| Terbufós          | 10,805      | 231                  | 103, 125            |
| Diazinon          | 10,825      | 179                  | 137, 152            |
| Dissulfotom       | 10,970      | 88                   | 89, 142             |
| Etrinfós          | 10,980      | 181                  | 292, 168            |
| Clorpirifós metil | 11,310      | 286                  | 288                 |
| Alaclor           | 11,370      | 160                  | 188, 146            |
| Ametrina          | 11,430      | 227                  | 212, 170            |
| Clorpirifós       | 11,750      | 197                  | 199, 314            |

FONTE: A AUTORA

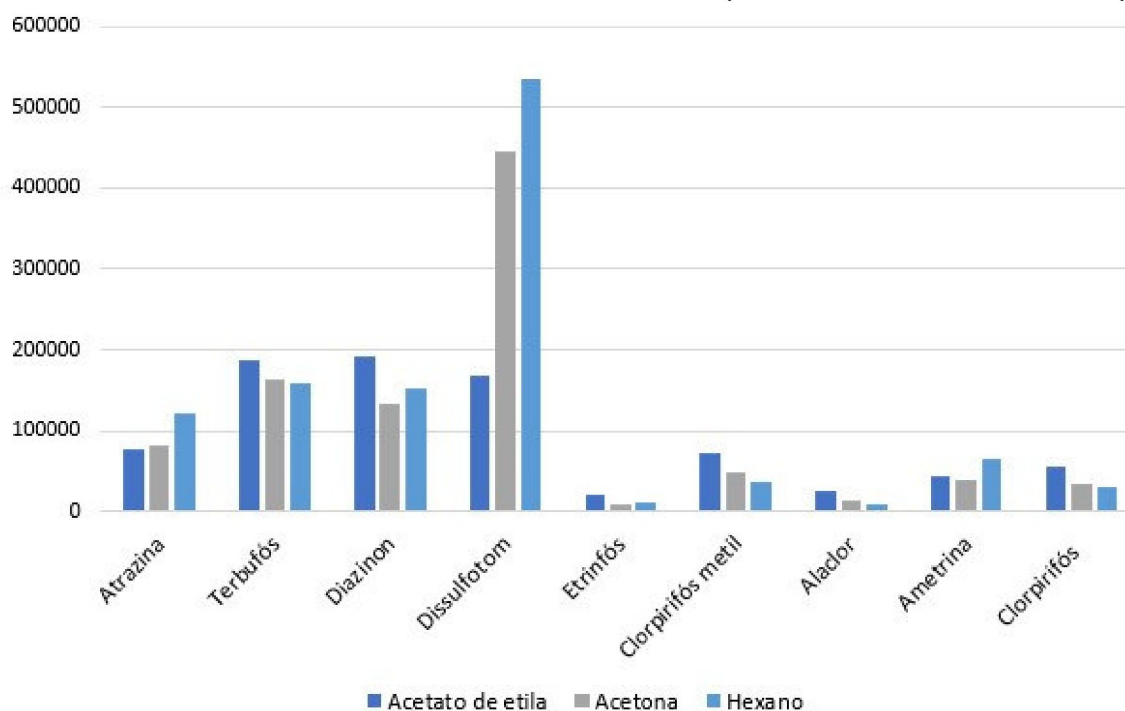
#### 4.4.4 Otimização do procedimento de microextração

##### 4.4.4.1 Dessorção

Inicialmente, a dessorção da fibra seria realizada no próprio solvente de extração, o 1-octanol, assim como em trabalhos anteriores, e o solvente seria injetado diretamente no sistema cromatográfico. Porém, devido à persistência deste solvente no sistema, e consequente contaminação de cromatogramas posteriores, foi avaliada a possibilidade de secagem do 1-octanol e posterior ressolubilização em outro solvente. A secagem do 1-octanol, porém, é dificultada pela sua baixa pressão de vapor, 0,08 mm Hg (PubChem). Na impossibilidade de estabelecer um procedimento de secagem que não fosse muito longo, optou-se por avaliar o uso de outro solvente para a etapa de dessorção.

Foram avaliados três solventes: acetato de etila, acetona e hexano. Foram realizadas extrações utilizando água purificada adicionada dos analitos e do padrão interno na concentração de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  e a dessorção foi realizada em ultrassom por 5 minutos. Para cada solvente de dessorção a análise foi realizada em duplicata. A média da área de pico obtida para cada composto utilizando cada um dos solventes de dessorção pode ser visualizada no gráfico da Figura 28.

FIGURA 28 – GRÁFICO DA ÁREA DOS COMPOSTOS EM FUNÇÃO DO SOLVENTE DE DESSORÇÃO



FONTE: A AUTORA

Analisando o gráfico, destaca-se o aumento na resposta obtida do dissulfotom quando utilizado acetona e hexano frente ao acetato de etila. Por sua vez, o acetato de etila apresentou melhor eficiência para diversos compostos, incluindo os que apresentaram menor resposta no geral, motivo pelo qual ele foi escolhido como solvente de dessorção para as próximas etapas.

Foi avaliado também o uso de agitação em vórtex para a dessorção em comparação com o ultrassom. Para isso, foi realizado um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> (Tabela 13) com os fatores modo de agitação em tempo. Os níveis dos fatores encontram-se na Tabela 14.

TABELA 13 – PLANEJAMENTO FATORIAL 2<sup>2</sup> DOS FATORES MODO DE AGITAÇÃO E TEMPO

| <b>Ensaio</b> | <b>Modo de agitação</b> | <b>Tempo</b> |
|---------------|-------------------------|--------------|
| 1             | -1                      | -1           |
| 2             | +1                      | -1           |
| 3             | -1                      | +1           |
| 4             | +1                      | +1           |

TABELA 14 – NÍVEIS DOS FATORES AVALIADOS

| <b>Fator</b>     | <b>Nível -1</b> | <b>Nível +1</b> |
|------------------|-----------------|-----------------|
| Modo de agitação | Vórtex          | Ultrassom       |
| Tempo (minutos)  | 1               | 5               |

Neste ensaio, os experimentos também foram realizados utilizando água ultrapura com adição dos analitos e do padrão interno na concentração 1 µg mL<sup>-1</sup>.

A Figura 29 traz os gráficos dos efeitos. É possível observar que o tempo tem maior influência ao utilizar o ultrassom como método de agitação (linha mais inclinada). Quando a agitação é realizada em vórtex, o aumento do tempo não influencia ou até causa uma diminuição na área de pico obtida para a maior parte dos analitos. Também pode-se notar que, à exceção do dissulfotom, a agitação em vórtex por 1 minuto apresentou melhor eficiência de dessorção do que o ultrassom em maior tempo.

Para os próximos experimentos, foi utilizada a agitação em vórtex por 1 minuto para a dessorção. Um estudo que poderia ser realizado seria a dessorção em vórtex por diversos intervalos de tempo para verificar em quanto tempo o equilíbrio é atingido, porém não houve tempo hábil para a realização deste experimento.

FIGURA 29 – GRÁFICOS DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS TEMPO E MODO DE AGITAÇÃO NA EFIÊNCIA DA DESSORÇÃO

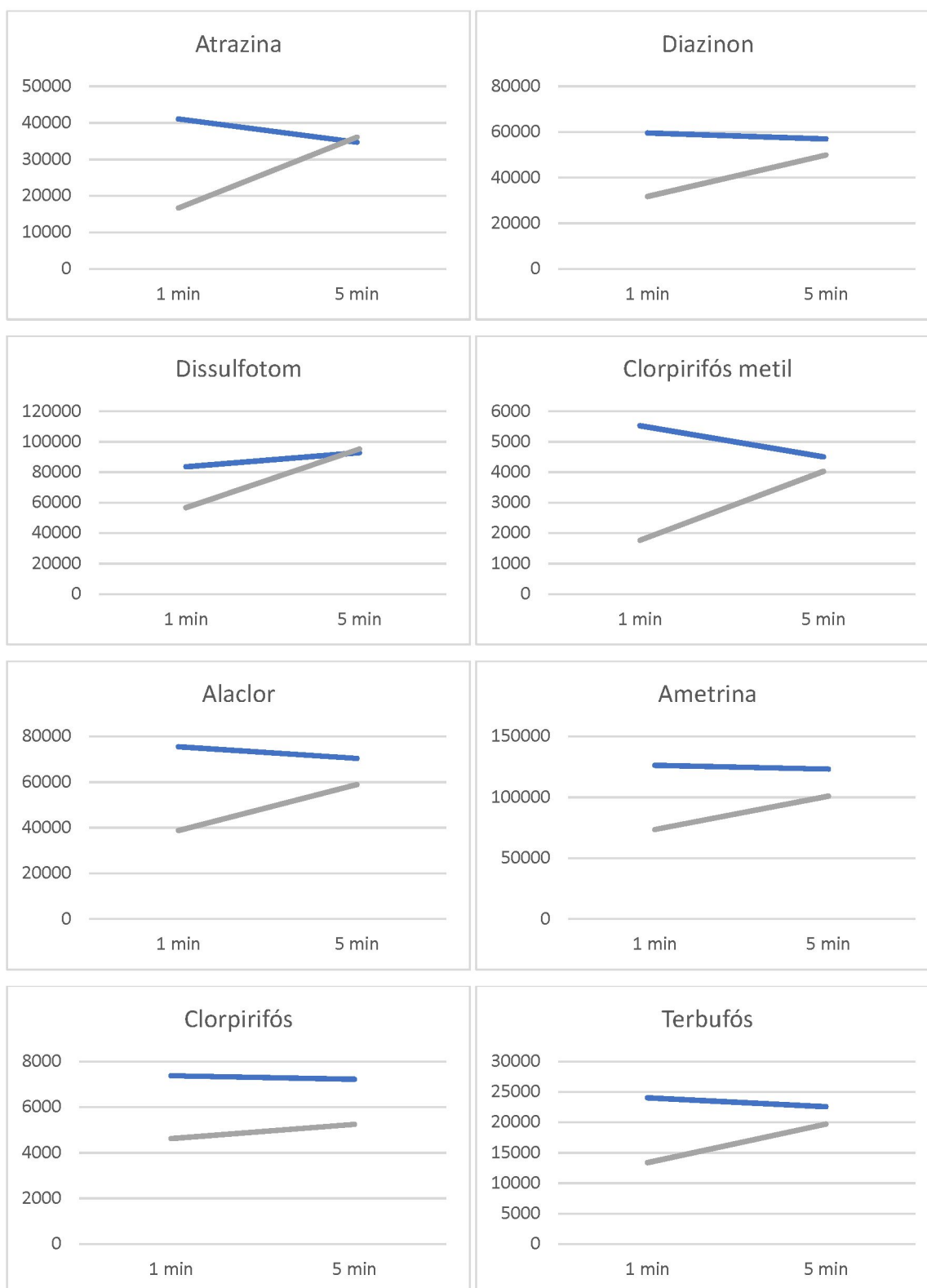
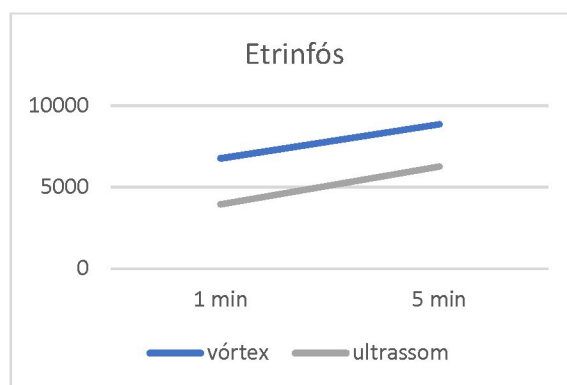


FIGURA 29 – GRÁFICOS DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS TEMPO E MODO DE AGITAÇÃO NA EFICIÊNCIA DA DESSORÇÃO (continuação)



FONTE: A AUTORA

#### 4.4.4.2 Otimização multivariada – pH, velocidade de agitação e adição de sal

Inicialmente, três fatores de otimização no processo da extração foram avaliados. Dentre os fatores descritos na literatura que influenciam a eficiência das microextrações em fase líquida (Seção 1.2.1), foram selecionados o pH, a velocidade de agitação e a adição de sal à fase doadora. Estes fatores foram otimizados de modo multivariado, já que esta abordagem apresenta vantagens sobre a otimização univariada, como redução no número de experimentos, resultando em menor consumo de reagentes e menos trabalho laboratorial. Além disso, a otimização multivariada permite a visualização de interação entre os fatores estudados, o que não é possível na otimização univariada (FERREIRA et al., 2007).

Foi realizado, então, um planejamento Box-Behnken para a otimização multivariada. O planejamento Box-Behnken é baseado no planejamento fatorial de 3 níveis incompleto. Os níveis de cada um dos fatores a serem avaliados estão dispostos na Tabela 15.

TABELA 15 – NÍVEIS DOS FATORES pH, VELOCIDADE DE AGITAÇÃO E ADIÇÃO DE SAL

| Fator                        | Nível -1 | Ponto central (0) | Nível +1 |
|------------------------------|----------|-------------------|----------|
| pH                           | 2        | 4                 | 6        |
| Velocidade de agitação (rpm) | 600      | 800               | 1000     |
| Sal (% m/v)                  | 0        | 2,5               | 5        |

O número de experimentos requerido no planejamento Box-Behnken é definido pela equação  $N = 2k(k - 1) + C_0$ , em que  $k$  é o número de fatores e  $C_0$  o número de replicatas do ponto central. Assim, tendo sido aqui selecionados três fatores, e realizando quintuplicata do ponto central, o planejamento resultou em 17 experimentos, conforme Tabela 16.

TABELA 16 – MATRIZ DO PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN

| <b>Ensaio</b> | <b>pH</b> | <b>Velocidade</b> | <b>Sal</b> |
|---------------|-----------|-------------------|------------|
| 1             | -1        | -1                | 0          |
| 2             | +1        | -1                | 0          |
| 3             | -1        | +1                | 0          |
| 4             | +1        | +1                | 0          |
| 5             | -1        | 0                 | -1         |
| 6             | +1        | 0                 | -1         |
| 7             | -1        | 0                 | +1         |
| 8             | +1        | 0                 | +1         |
| 9             | 0         | -1                | -1         |
| 10            | 0         | +1                | -1         |
| 11            | 0         | -1                | +1         |
| 12            | 0         | +1                | +1         |
| 13            | 0         | 0                 | 0          |
| 14            | 0         | 0                 | 0          |
| 15            | 0         | 0                 | 0          |
| 16            | 0         | 0                 | 0          |
| 17            | 0         | 0                 | 0          |

De modo a avaliar conjuntamente a resposta obtida para todos os analitos em estudo, as áreas de pico de cada analito nos dezessete ensaios foi convertida para a função desejabilidade. A desejabilidade é uma escala que varia de 0 a 1. O valor inferior da escala (L), foi definido como 50% da menor área obtida para cada analito, enquanto o valor superior (U) foi fixado como a maior área obtida mais 50%. A partir destes valores, a desejabilidade de cada analito em cada ensaio foi calculada pela seguinte fórmula:

$$d = \frac{\text{área do pico} - L}{U - L}$$

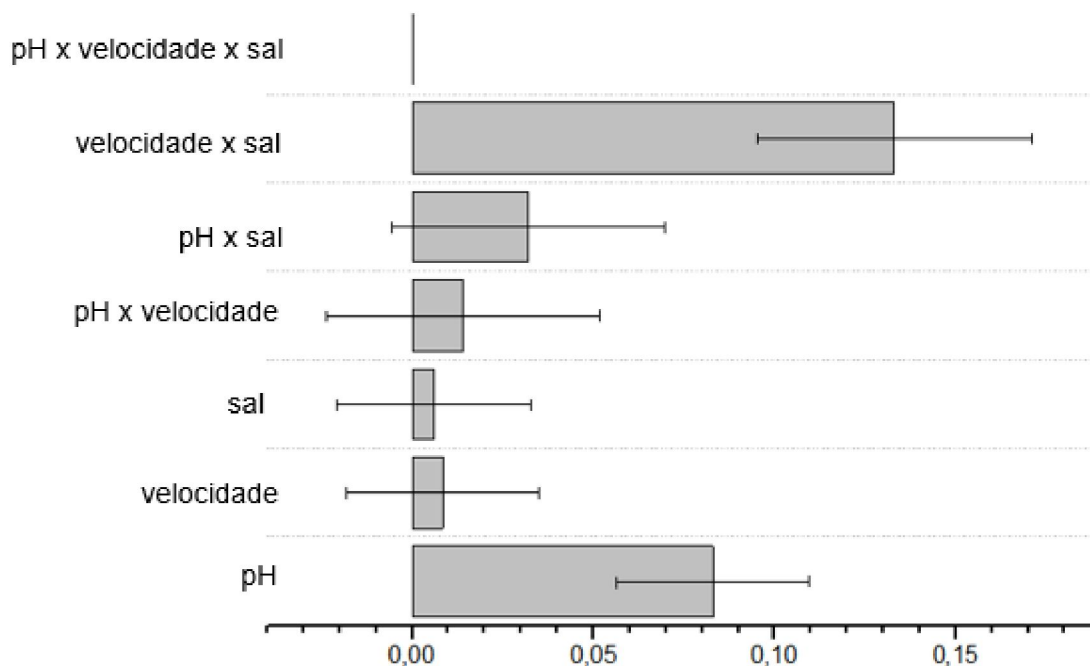
A partir das desejabilidades individuais, a desejabilidade geral de cada ensaio (D) foi obtida através da média geométrica das desejabilidades de cada analito no ensaio em questão. Os resultados de desejabilidade obtidos no planejamento efetuado estão expressas na Tabela 17.

Com os valores de desejabilidade de cada ensaio, foi realizada a regressão linear múltipla para avaliar a correlação entre as variáveis e o resultado observado. Na Figura 30 é possível observar o gráfico dos efeitos de cada variável.

TABELA 17 – VALORES DE DESEJABILIDADE

| <b>Ensaio</b> | <b>Atrazina</b> | <b>Diazinon</b> | <b>Dissulfotom</b> | <b>Clorpirifós metil</b> | <b>Alaclor</b> | <b>Ametrina</b> | <b>Clorpirifós</b> | <b>Terbufós</b> | <b>Etrinfós</b> | <b>Desejabilidade (D)</b> |
|---------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------------|----------------|-----------------|--------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|
| 1             | 0,1047367       | 0,06704547      | 0,033864802        | 0,057392777              | 0,195997       | 0,06146013      | 0,09590478         | 0,024758        | 0,106114        | 0,070203802               |
| 2             | 0,1434056       | 0,19267946      | 0,118938837        | 0,048363431              | 0,303358       | 0,3093271       | 0,085543639        | 0,13682797      | 0,3929534       | 0,159968882               |
| 3             | 0,0173045       | 0,02704617      | 0,022103655        | 0,034593679              | 0,03445        | 0,00826329      | 0,042729005        | 0,00711483      | 0,0642487       | 0,023255997               |
| 4             | 0,1187582       | 0,19905816      | 0,134082292        | 0,044920993              | 0,288357       | 0,2459789       | 0,044056258        | 0,14277635      | 0,2697064       | 0,137117926               |
| 5             | 0,1366235       | 0,36466843      | 0,196911851        | 0,65513544               | 0,405878       | 0,03822429      | 0,106779697        | 0,22382181      | 0,4784801       | 0,218609234               |
| 6             | 0,1771772       | 0,40766135      | 0,294620644        | 0,178047404              | 0,388544       | 0,39922282      | 0,190353863        | 0,32600474      | 0,622038        | 0,304771145               |
| 7             | 0,1412829       | 0,06077615      | 0,017430489        | 0,132731377              | 0,154873       | 0,05800529      | 0,038019395        | 0,01256836      | 0,1141278       | 0,059768071               |
| 8             | 0,2706499       | 0,23000178      | 0,17259418         | 0,188882619              | 0,465953       | 0,44385892      | 0,136878385        | 0,16536809      | 0,4475302       | 0,253030308               |
| 9             | 0,2070926       | 0,39717794      | 0,287206688        | 0,331151242              | 0,482387       | 0,4569084       | 0,141416736        | 0,28735539      | 0,6452504       | 0,329040474               |
| 10            | 0,1781165       | 0,13911677      | 0,102196805        | 0,148984199              | 0,236946       | 0,32475934      | 0,058998566        | 0,11612476      | 0,2908463       | 0,15696808                |
| 11            | 0,2555068       | 0,14619782      | 0,106510095        | 0,197121896              | 0,337063       | 0,46637261      | 0,129000492        | 0,10628822      | 0,2509154       | 0,195860264               |
| 12            | 0,6608985       | 0,65765128      | 0,660856504        | 0,165406321              | 0,655183       | 0,66391224      | 0,653993535        | 0,66429506      | 0,3277375       | 0,523295618               |
| 13            | 0,2242843       | 0,17287554      | 0,133711985        | 0,0746614                | 0,321767       | 0,45540685      | 0,08010618         | 0,12422426      | 0,2101554       | 0,170004903               |
| 14            | 0,1762533       | 0,19795858      | 0,17358775         | 0,084424379              | 0,27826        | 0,3614614       | 0,084387644        | 0,1939789       | 0,1688428       | 0,173457065               |
| 15            | 0,2655765       | 0,21376718      | 0,160893013        | 0,057900677              | 0,350301       | 0,4801506       | 0,145526941        | 0,15186556      | 0,1413472       | 0,186870155               |
| 16            | 0,2748521       | 0,28294848      | 0,216772804        | 0,070598194              | 0,341757       | 0,52295112      | 0,083659795        | 0,23173952      | 0,1110881       | 0,197543626               |
| 17            | 0,2860341       | 0,22437724      | 0,184644792        | 0,060440181              | 0,303717       | 0,56036578      | 0,165521375        | 0,19341335      | 0,1149568       | 0,197084626               |

FIGURA 30 – GRÁFICO DOS EFEITOS pH, VELOCIDADE DE AGITAÇÃO E ADIÇÃO DE SAL NA EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO



FONTE: A AUTORA

Analisando-se os resultados obtidos, é possível observar que a única variável que apresentou um efeito significativo isoladamente foi o pH. Nas demais variáveis (velocidade de agitação e adição de sal), o erro experimental foi superior ao efeito observado.

Para melhor eficiência de técnicas de extração em fase líquida em geral, o pH deve ser ajustado de modo a manter os analitos na forma não ionizada, aumentando assim sua solubilidade no solvente orgânico. Neste trabalho, foram incluídos tanto analitos ácidos quanto básicos, além de analitos não ionizáveis que não sofrem influência do pH. Desta forma, como os analitos não se comportam da mesma maneira, não seria possível estabelecer um pH em que todos se encontrassem predominantemente não ionizados, sendo necessário estabelecer uma condição de compromisso.

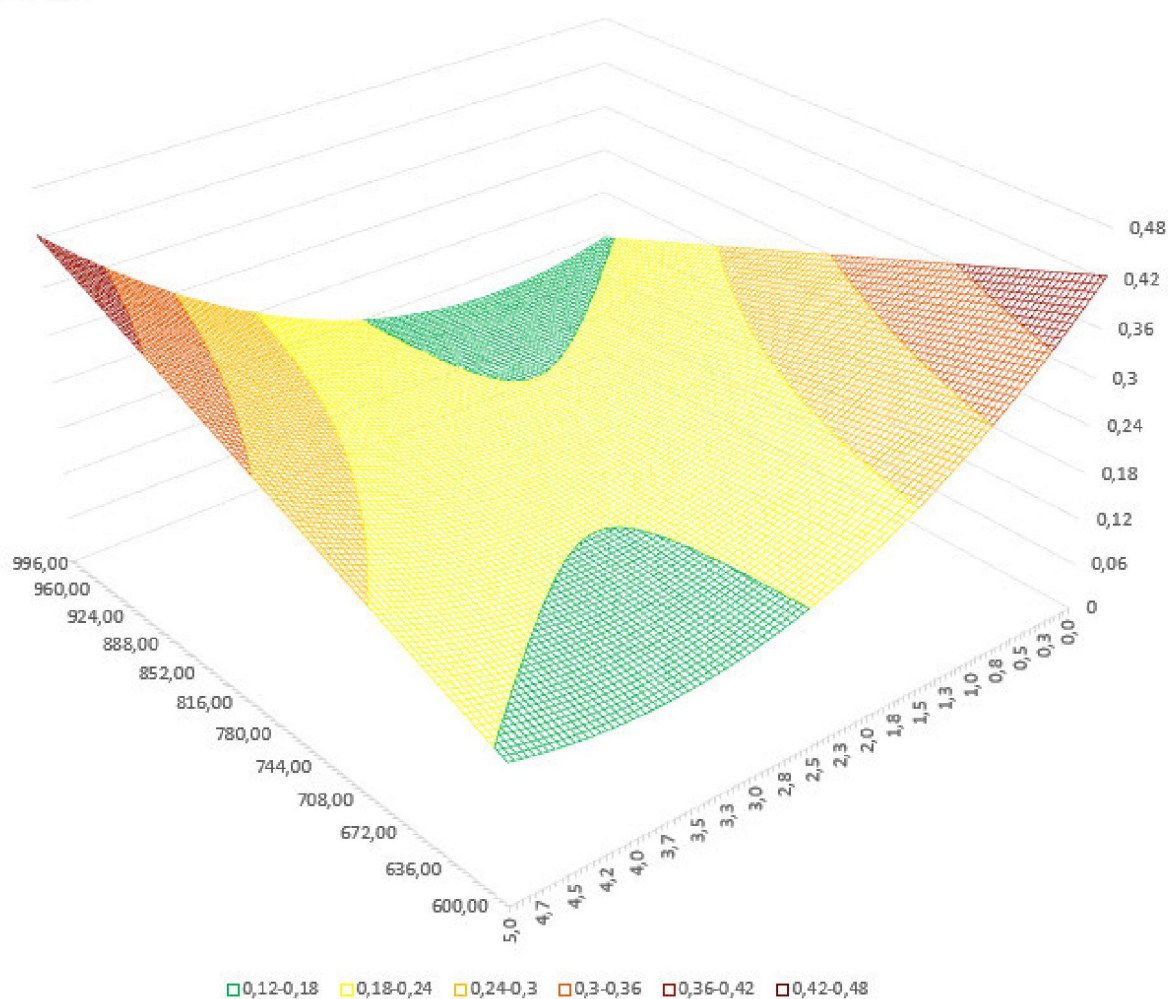
O efeito apresentado pelo pH nos ensaios de otimização foi positivo, ou seja, quanto maior o pH, maior a eficiência da extração. Valores de pH mais altos favorecem especialmente os analitos básicos, ametrina e atrazina, que se encontram predominantemente na forma não ionizada em valores de pH superiores ao seu pKa (4,1 e 1,6, respectivamente). Devido ao efeito positivo, o pH foi mantido em 6 para os demais ensaios.

Dentre os outros fatores avaliados, conforme discutido na Seção 1.2.1, o efeito da adição de sal é bastante variável já que, ao mesmo tempo em que pode aumentar a eficiência de extração devido ao efeito *salting-out*, o aumento decorrente da viscosidade da fase

doadora pode dificultar a extração. Já no caso da velocidade de agitação, era esperado uma maior eficiência de extração com o aumento da agitação do sistema, o que não foi observado. Pode-se supor que, nesse caso, a velocidade mais baixa aplicada já fosse alta o suficiente para otimizar este efeito.

Apesar de estas duas variáveis, isoladamente, não terem apresentado efeito significativo na eficiência de extração, foi verificado um efeito de interação entre elas. De forma a melhor avaliar a condição em que estes fatores apresentam melhor resposta, foi plotada a superfície de resposta (Figura 31).

FIGURA 31 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DOS FATORES VELOCIDADE DE AGITAÇÃO E ADIÇÃO DE SAL



FONTE: A AUTORA

De acordo com a superfície de resposta, as melhores respostas são obtidas em agitação mais baixa (600 rpm) sem adição de sal, e em agitação mais alta (1000 rpm) com adição de sal na concentração a 5% (m/v). Tal constatação é condizente com o fato de que a adição de sal à fase doadora pode aumentar a viscosidade do meio, o que dificulta a difusão

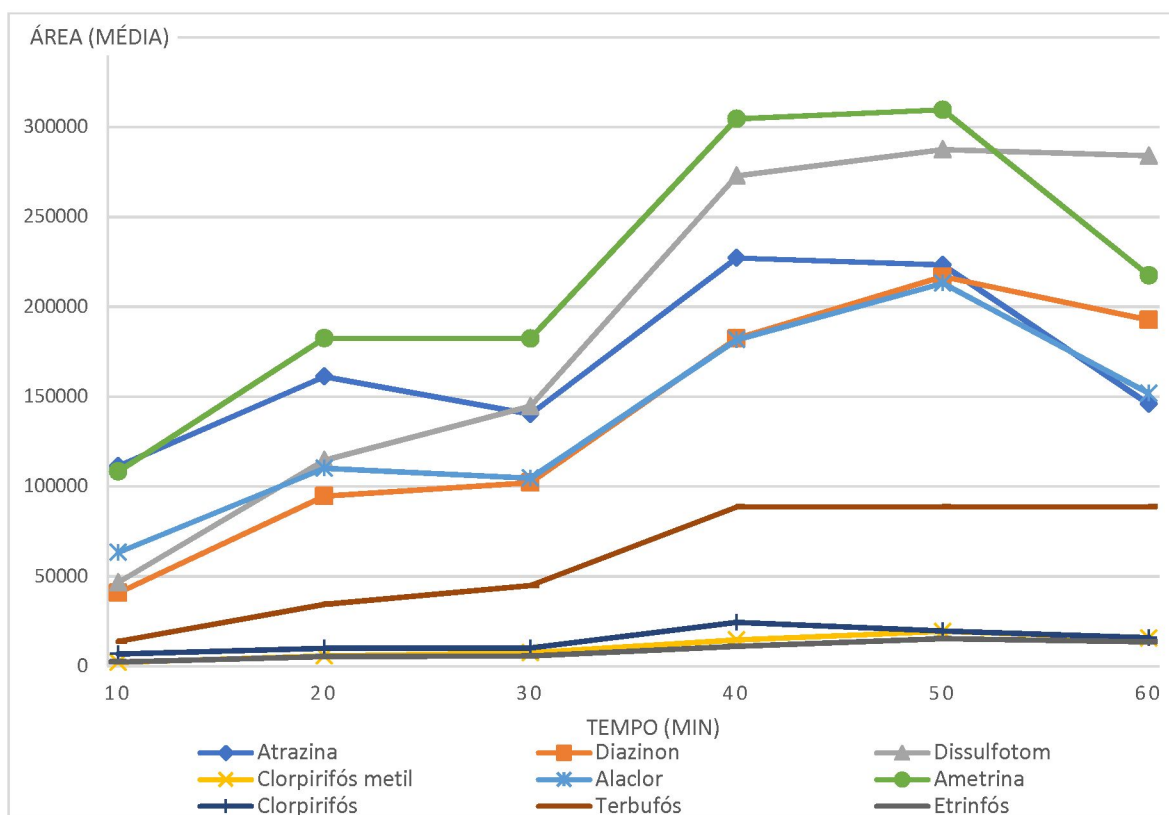
dos analitos sendo, assim, necessária uma maior velocidade de agitação para compensar este fator negativo.

Dentre as duas condições de resposta máxima, decidiu-se por utilizar a agitação em 600 rpm e sem adição de sal, já que assim elimina-se o uso de um reagente, gerando economia e maior facilidade na realização dos experimentos.

#### 4.4.4.3 Otimização do tempo de extração

Fixados os valores das variáveis analisadas de modo multivariado (pH: 6, velocidade de agitação: 600 rpm, sem adição de sal), partiu-se para a otimização univariada do tempo de extração. Foram realizadas extrações por períodos de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos, em triplicata. Os extratos foram submetidos à análise por GC/MS e o gráfico da média das áreas de pico obtidas para cada analito e para o padrão interno, em função do tempo, pode ser visualizado na Figura 32.

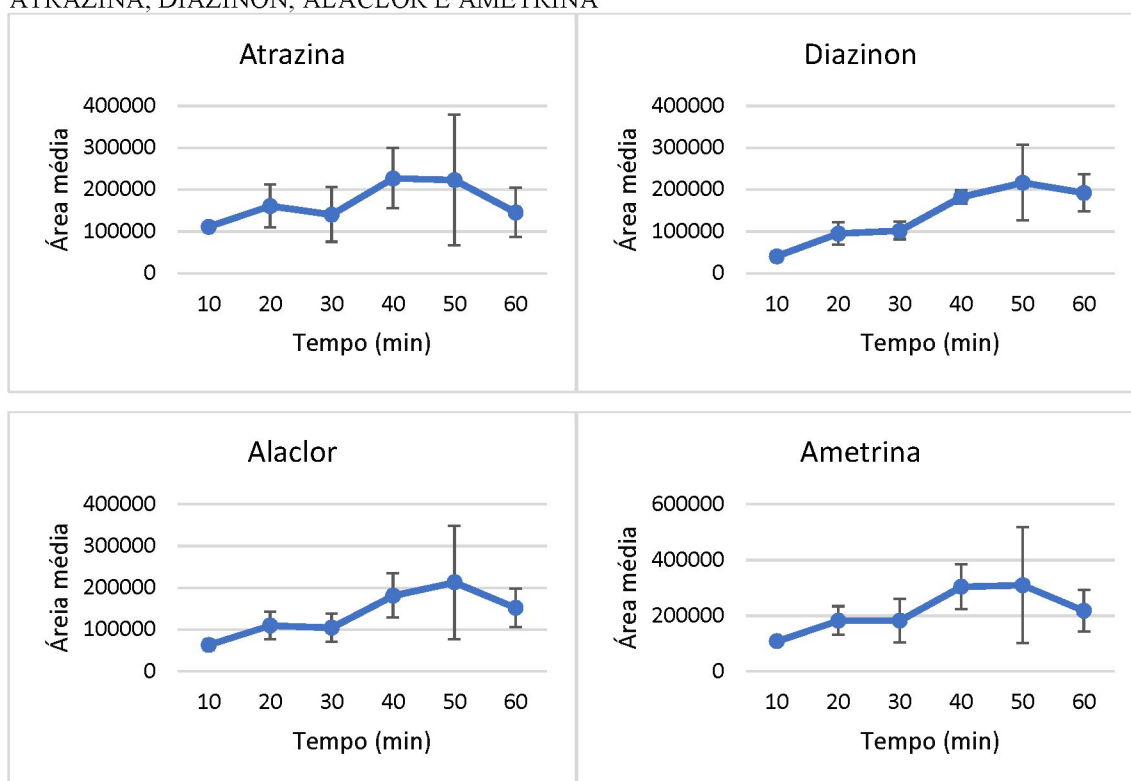
FIGURA 32 – GRÁFICO DA RESPOSTA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO



FONTE: A AUTORA

Analisando o gráfico, é possível observar que todos os compostos apresentam aumento na resposta até os 40 minutos. Após este período, alguns compostos continuam tendo um aumento, destacando-se o alaclor e o diazinon. Após 50 minutos é possível também observar uma queda nas respostas dos compostos ametrina, atrazina e alaclor. Porém, ao visualizar o gráfico de cada substância isoladamente, com suas respectivas barras de erro (Figura 33), nota-se que essas aparentes alterações encontram-se dentro do desvio padrão e não são significativas.

FIGURA 33 – GRÁFICO DA RESPOSTA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS ATRAZINA, DIAZINON, ALACLOR E AMETRINA



FONTE: A AUTORA

Com base nesses resultados, o tempo de extração foi mantido em 40 minutos para a avaliação dos parâmetros de mérito.

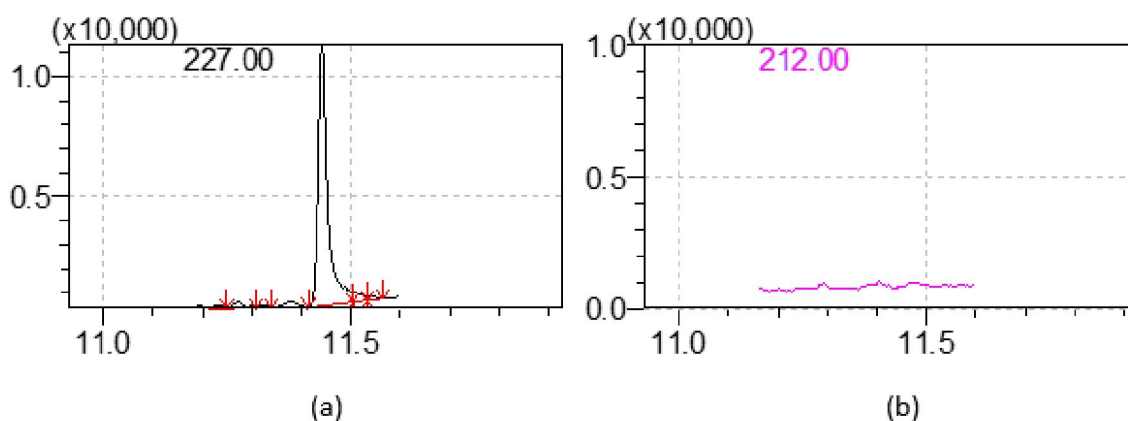
#### 4.4.5 Avaliação dos parâmetros de mérito

##### 4.4.5.1 Seletividade

Primeiramente, foi avaliada a seletividade do método desenvolvido. Para tanto, foram analisadas 10 amostras de sangue branco de matriz, de fontes diferentes, para verificar

a possível presença de interferentes da própria matriz. Nessa análise, foi possível verificar a presença, em todos os cromatogramas do íon  $m/z$  227 no tempo de retenção em que elui o composto ametrina (11,43 min), conforme pode ser observado na Figura 34a.

FIGURA 34 – INTERFERENTE DE MATRIZ NO ENSAIO DE SELETIVIDADE



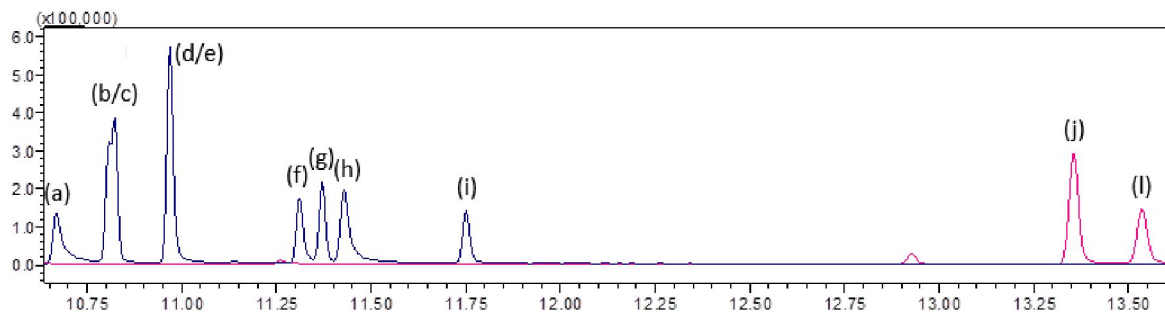
FONTE: A AUTORA

O íon  $m/z$  227 havia sido selecionado previamente como íon de quantificação para este composto. Com a detecção deste interferente, foi feita a mudança do íon de quantificação para o íon  $m/z$  212, segundo mais abundante no espectro de massas da ametrina e que não apresentou interferência (Figura 34b).

Foi avaliada também a possível interferência de outros compostos que pudessem estar presente nas amostras através da análise de diversos compostos, incluindo drogas de abuso e medicamentos. Um mix de padrões dos compostos selecionados para o estudo foi analisado pelo método cromatográfico padronizado, no modo de aquisição *full scan*. Dentre os compostos avaliados, foram detectados apenas a imipramina, um antidepressivo da classe dos antidepressivos tricíclicos, e a cocaína, uma droga de abuso. Ambos os compostos, porém, eluíram em tempo de retenção superior ao do último analito (13,5 min e 13,3 min respectivamente), conforme pode ser visualizado na Figura 35 que mostra a sobreposição do cromatograma dos padrões dos analitos e do cromatograma dos compostos do ensaio de seletividade.

Além da injeção direta dos padrões, os mesmos foram adicionados a uma amostra de sangue branco de matriz que foi submetida ao procedimento de extração e posterior análise cromatográfica também no método *full scan*. Neste ensaio, foi possível verificar que, os dois compostos detectados no ensaio anterior (imipramina e cocaína) não foram extraídos pelo método utilizado.

FIGURA 35: CROMATOGRAMAS DOS ANALITOS E DOS COMPOSTOS DO ENSAIO DE SELETIVIDADE



(a) Atrazina; (b) Terbufós; (c) Diazinon; (d) Dissulfotom; (e) Etrinofós; (f) Clorpirifós metil; (g) Alaclor; (h) Ametrina; (i) Clorpirifós; (j) Cocaína; (l) Imipramina

FONTE: A AUTORA

#### 4.4.5.2 Lineariedade

Para a avaliação da lineariedade, foram construídas curvas analíticas que devem ser avaliadas pelo seu coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e pela análise dos resíduos.

A Figura 36 traz uma curva construída para cada analito, bem como os respectivos resíduos, e a Tabela 18 traz as equações de reta e os valores de  $R^2$  obtidos.

FIGURA 36 – CURVAS ANALÍTICAS E PLOTAGEM DOS RESÍDUOS

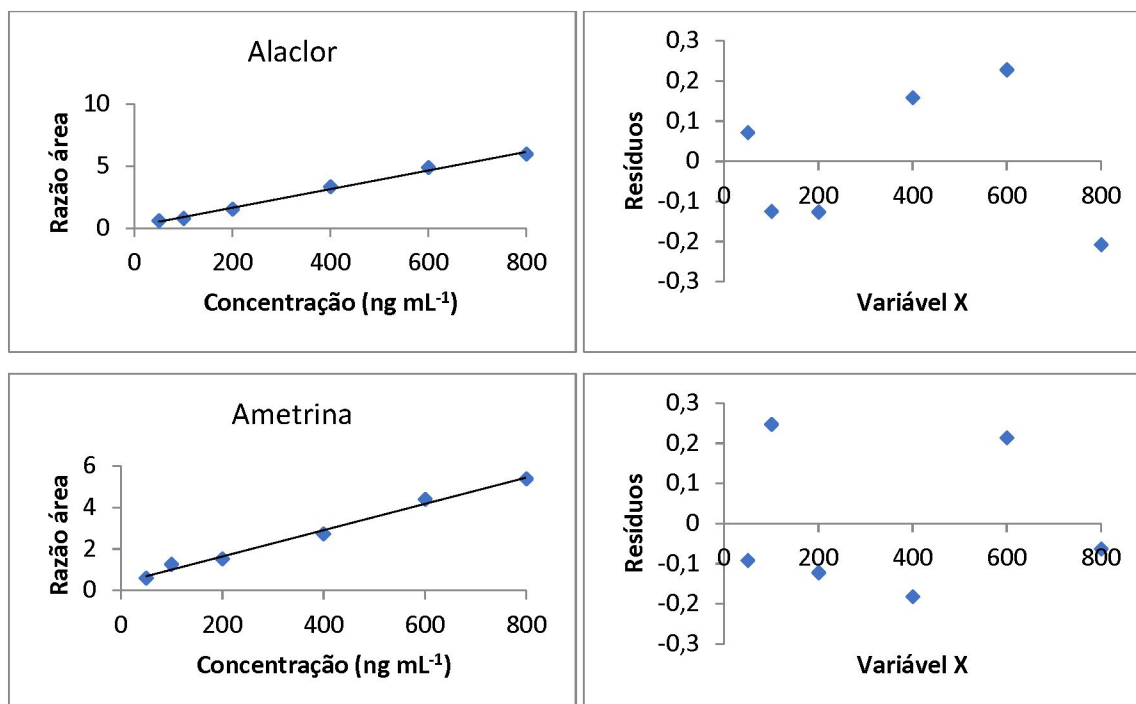


FIGURA 36 – CURVAS DE CALIBRAÇÃO E PLOTAGEM DOS RESÍDUOS (continuação)

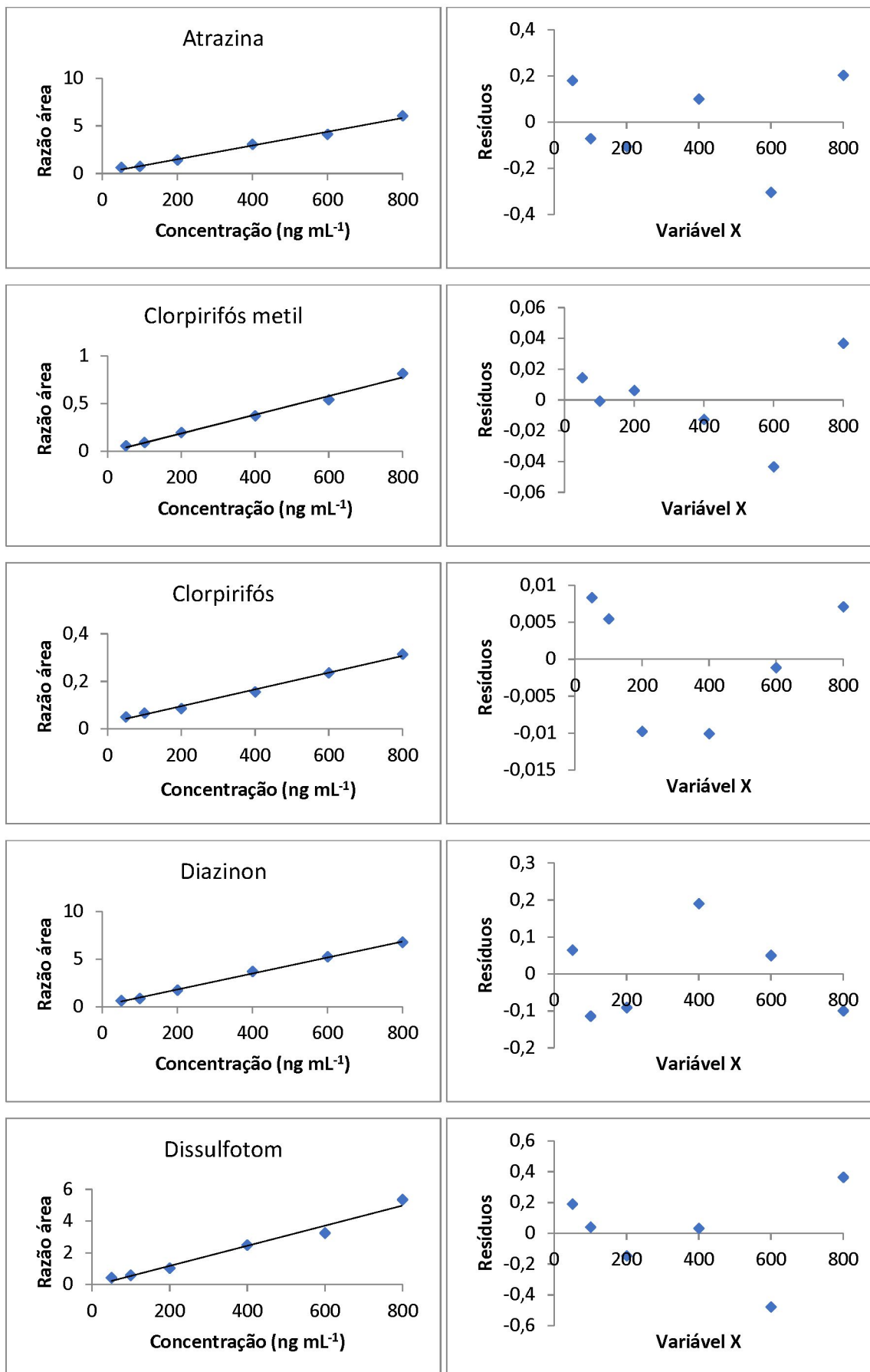
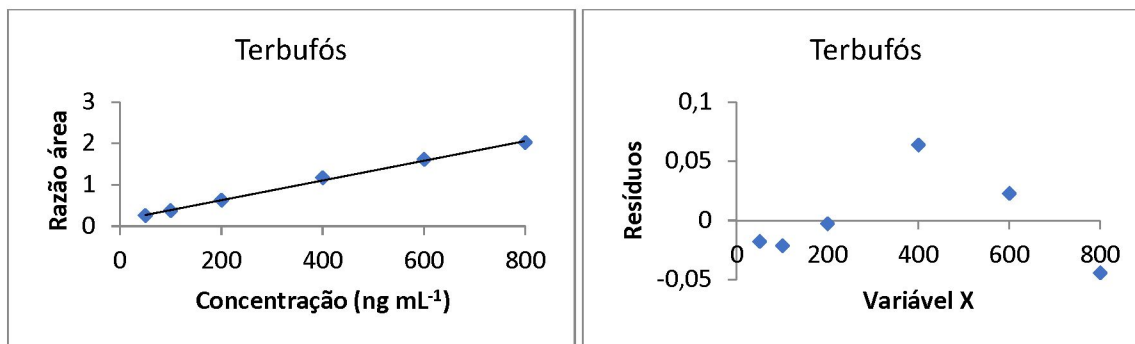


FIGURA 36 – CURVAS DE CALIBRAÇÃO E PLOTAGEM DOS RESÍDUOS (continuação)



FONTE: A AUTORA

TABELA 18 – EQUAÇÕES DA RETA E COEFICIENTES DE DETERMINAÇÃO

| Analito           | Equação da reta           | R <sup>2</sup> |
|-------------------|---------------------------|----------------|
| Atrazina          | $y = 0,00721 x + 0,06806$ | 0,990          |
| Diazinon          | $y = 0,00840 x + 0,15797$ | 0,997          |
| Dissulfotom       | $y = 0,00633 x - 0,08165$ | 0,971          |
| Clorpirifós metil | $y = 0,00098 x - 0,00810$ | 0,989          |
| Alaclor           | $y = 0,00751 x + 0,17006$ | 0,992          |
| Ametrina          | $y = 0,00635 x + 0,37854$ | 0,988          |
| Clorpirifós       | $y = 0,00035 x + 0,02584$ | 0,992          |
| Terbufós          | $y = 0,00239 x + 0,15200$ | 0,996          |

FONTE: A AUTORA

É possível observar que foram obtidos valores elevados de coeficiente de determinação para todos os analitos, indicando que o modelo linear de calibração é satisfatório. Além disso, os resíduos se distribuem de maneira aleatória, não demonstrando nenhuma tendência, o que também é um fator favorável para avaliação do modelo.

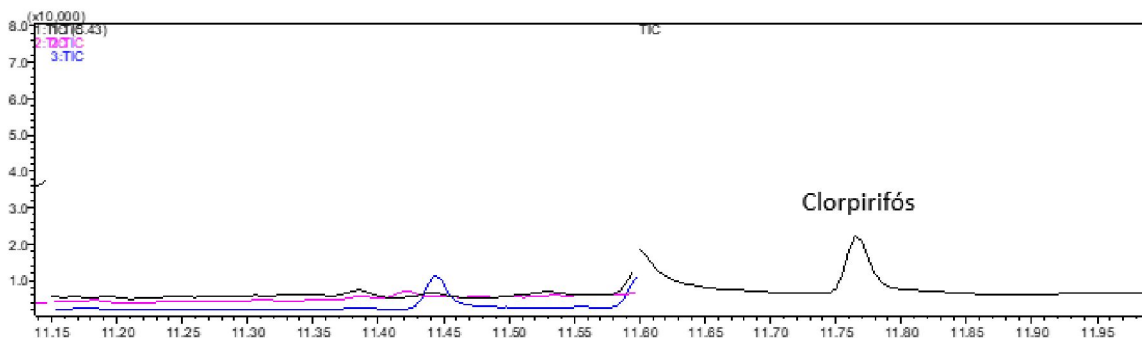
#### 4.4.5.3 Carryover

Foi avaliado o *carryover* (efeito memória) através da injeção de um branco após o último ponto da curva de calibração, em triplicata. Em nenhuma das análises foi detectado algum dos analitos ou o padrão interno, de forma que pode-se concluir que o método é livre de efeito memória até a concentração de 800 ng mL<sup>-1</sup>.

#### 4.4.6 Aplicação do método em amostra real

O método desenvolvido foi aplicado em uma amostra real recebida pelo Laboratório de Toxicologia da Polícia Científica do Paraná. Um indivíduo do sexo masculino foi encontrado em óbito em sua residência com histórico de possível intoxicação exógena por cipermetrina. A amostra de sangue recebida foi analisada pelo método de triagem preconizado no Laboratório e foi identificada a presença de cipermetrina e clorpirifós, compostos utilizados em associação em produtos antiparasitários de uso veterinário. Esta mesma amostra foi submetida ao método desenvolvido, através do qual foi possível a detecção do clorpirifós, conforme pode ser visualizado no cromatograma na Figura 37.

FIGURA 37 – CROMATOGRAMA OBTIDO DE ANÁLISE DE AMOSTRA REAL



FONTE: A AUTORA

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Foi possível avaliar que a microextração com fibra oca não atende as necessidades de uma triagem abrangendo uma ampla gama de analitos em comparação com a extração líquido-líquido, visto que alguns analitos são extraídos apenas em condições específicas (como os analitos extraídos apenas no sistema em 3 fases), impossibilitando o desenvolvimento de uma única extração. A extração líquido-líquido foi capaz de extrair diversos compostos que não foram extraídos em nenhuma das condições estudadas com a fibra oca. São eles: aldicarbe, metomil, imidacloprida, propoxur e difacinona. Tal fato não significa que estes compostos não sejam possíveis de serem extraídos, apenas reforça a seletividade da extração e a exigência de condições específicas para cada composto.

Porém, ela se mostrou capaz de extrair diversos compostos ajustando-se as condições, destacando-se os compostos ionizáveis de maior polaridade 2,4-D, picloram e bentazona, que não foram extraídos pela extração líquido-líquido mas foram extraídos pela HF-LPME em 3 fases. Isso demonstra que as técnicas podem ser facilmente aplicadas em análises confirmatórias, em que já há um ou mais analitos alvos, ou em casos em que há suspeita de ingestão de um composto específico, de maneira bastante seletiva.

Ademais, a utilização da microextração em fibra oca (HF $\mu$ E) em detrimento da microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME) torna o processo de extração muito mais simples, sem depender de habilidade do operador para inserir e retirar a fase aceptora do lúmen, e dispensando a utilização de seringas. Essas características tornam a HF $\mu$ E mais facilmente aplicável em uma rotina laboratorial e também facilitam a realização de mais de uma extração simultaneamente, aumentando a frequência analítica, fator extremamente desejável na rotina.

Com base nos resultados obtidos nas primeiras análises de triagem, foi possível selecionar compostos que responderam bem à técnica de HF $\mu$ E e foi desenvolvido um método por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC/MS) incluindo os compostos clorpirifós, clorpirifós-metil, diazinon, dissulfotom, terbufós, alacloro, ametrina e atrazina.

O método foi otimizado, utilizando-se técnicas de otimização multivariada e univariada. Foi possível observar o efeito do pH na eficiência da extração, bem como um efeito de interação entre os fatores adição de sal e velocidade de agitação.

Estabelecidas as melhores condições de extração dentre as variáveis avaliadas, iniciou-se a avaliação dos parâmetros de mérito. O método foi ainda aplicado em uma amostra real da Polícia Científica do Paraná.

## REFERÊNCIAS

ALONZO, H. G. A.; CORRÊA, C. L. Praguicidas. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. DE A.; BATISTUZZO, J. A. DE O. (Eds.). . **Fundamentos de Toxicologia**. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2014. p. 323–341.

ALSHARIF, A. M. A. et al. Efficiency of hollow fiber liquid-phase microextraction chromatography methods in the separation of organic compounds: A review. **Journal of Chromatographic Science**, v. 55, n. 3, p. 378–391, 2017.

AMERICAN ACADEMY OF FORENSIC SCIENCE. Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. **Journal of Analytical Toxicology**, p. 1–40, 2019.

ANVISA. **Monografias de Agrotóxicos**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 30 mar. 2020.

BOMBANA, H. S. et al. Hollow-fibre liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometric determination of amphetamines in whole blood. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1139, n. January, p. 121973, 2020.

BROECKER, S. et al. Development and practical application of a library of CID accurate mass spectra of more than 2,500 toxic compounds for systematic toxicological analysis by LC-QTOF-MS with data-dependent acquisition. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 1, p. 101–117, 2011.

CAMPILLO, N. et al. Liquid-phase microextraction : update May 2016 to December 2018. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 0, n. 0, p. 1–20, 2019.

**CAS Common Chemistry**. Disponível em: <<https://commonchemistry.cas.org/>>.

CHASIN, A. A. DA M.; LIMA, I. V. Toxicologia Forense. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. DE A.; BATISTUZZO, J. A. DE O. (Eds.). . **Fundamentos de Toxicologia**. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu , 2014. p. 639–644.

CHUNG, H.; CHOE, S. Overview of Forensic Toxicology, Yesterday, Today and in the Future. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 36, p. 5429–5436, 2018.

COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Eds.). . **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2017. p. 17–45.

COLOVIC, M. B. et al. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315–335, 2013.

COPE, W. G.; LEIDY, R. B.; HODGSON, E. Classes of Toxicants: Use Classes. In: HODGSON, E. (Ed.). . **A Textbook of Modern Toxicology**. 3. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc, 2004. p. 49–74.

COSTA, L. G. Efeitos Tóxicos dos Praguicidas. In: KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. (Eds.). . **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. p. 311–323.

DE ZEEUW, R. A. Drug screening in biological fluids. The need for a systematic approach. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 689, n. 1, p. 71–79, 1997.

DMITRIENKO, S. G. et al. Liquid–Liquid Extraction of Organic Compounds into a Single Drop of the Extractant: Overview of Reviews. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 76, n. 8, p. 907–919, 2021.

DOS SANTOS, M. F. et al. Determination of antidepressants in whole blood using hollow-fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Forensic Toxicology**, v. 32, n. 2, p. 214–224, 2014.

ESRAFILI, A. et al. Two-phase hollow fiber liquid-phase microextraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 108, p. 314–322, 2018.

FARAJZADEH, M. A.; SOROURADDIN, S. M.; MOGADDAM, M. R. A. Liquid phase microextraction of pesticides: A review on current methods. **Microchimica Acta**, v. 181, n. 9–10, p. 829–851, 2014.

FERREIRA, S. L. C. et al. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, n. 2, p. 179–186, 2007.

FLANAGAN, R. J. et al. Other substances encountered in clinical and forensic toxicology. In: JICKELLS, S.; NEGRUSZ, A. (Eds.). . **Clarke's Analytical Forensic Toxicology**. 1. ed. London: Pharmaceutical Press, 2008. p. 79–134.

GALLETTI, G. C. et al. Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry and electron impact-, fast atom bombardment-mass spectrometry of sulfonylureas. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 21, n. 1–2, p. 239–247, 1991.

GHAMBARIAN, M.; YAMINI, Y.; ESRAFILI, A. Developments in hollow fiber based liquid-phase microextraction: Principles and applications. **Microchimica Acta**, v. 177, n. 3–4, p. 271–294, 2012.

GOLDBERGER, B. A.; WILKINS, D. G. Analytical and Forensic Toxicology. In: KLAASSEN, C. D. (Ed.). . **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. 8. ed. [s.l.] McGraw Hill Education, 2013. p. 1357–1374.

GRØNHAUG HALVORSEN, T.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Reduction of extraction times in liquid-phase microextraction. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 760, n. 2, p. 219–226, 2001.

HALVORSEN, T. G. et al. Liquid-phase microextraction combined with flow-injection tandem mass spectrometry: Rapid screening of amphetamines from biological matrices. **Journal of Separation Science**, v. 24, n. 7, p. 615–622, 2001.

HALVORSEN, T. G. et al. Liquid-phase microextraction combined with liquid

chromatography-mass spectrometry. Extraction from small volumes of biological samples. **Journal of Separation Science**, v. 26, n. 17, p. 1520–1526, 2003.

HANSEN, F.; ØIESTAD, E. L.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. **Bioanalysis of pharmaceuticals using liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography–mass spectrometry** **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2020.

HAVLIKOVA, M. et al. Critical evaluation of microextraction pretreatment techniques—Part 2: Membrane-supported and homogenous phase based techniques. **Journal of Separation Science**, v. 42, n. 1, p. 303–318, 2019.

HE, Y. Recent advances in application of liquid-based micro-extraction: A review. **Chemical Papers**, v. 68, n. 8, p. 995–1007, 2014.

HE, Y.; CONCEIRO-GUISAN, M. Microextraction sample preparation techniques in forensic analytical toxicology. **Biomedical Chromatography**, v. 33, n. 1, p. 1–12, 2019.

HORTA, R. P. **Microextração em fase líquida com fibra oca na determinação de fármacos inibidores da bomba de prótons em amostras de plasma humano por cromatografia líquida e detecção espectrofotométrica**. Orientador: Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva. 91 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

IDE, A. H.; NOGUEIRA, J. M. F. Hollow fiber microextraction: a new hybrid microextraction technique for trace analysis. 2018.

IDE, A. H.; NOGUEIRA, J. M. F. Dual-hollow fiber microextraction ( dual-HF  $\mu$  E ) - application for monitoring trace levels of organochlorine pesticides in real matrices. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 00, n. 00, p. 1–13, 2019a.

IDE, A. H.; NOGUEIRA, M. F. Novas perspectivas em técnicas de microextração estática. v. 11, n. 4, p. 143–155, 2019b.

JIANG, X.; LEE, H. K. Solvent Bar Microextraction. v. 76, n. 18, p. 5591–5596, 2004.

JONES, G. R. Postmortem Toxicology. In: JICKELLS, S.; NEGRUSZ, A. (Eds.). **Clarke's Analytical Forensic Toxicology**. 1. ed. London: Pharmaceutical Press, 2008. p. 191–217.

KAILASA, S. K. et al. **Applications of single-drop microextraction in analytical chemistry: A review** **Trends in Environmental Analytical Chemistry** Elsevier Inc., 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.teac.2020.e00113>>

KALA, M. Pesticides. In: MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. (Eds.). **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material**. 4. ed. London: Pharmaceutical Press, 2011. p. 258–287.

LACASSIE, E. et al. Sensitive and specific multiresidue methods for the determination of pesticides of various classes in clinical and forensic toxicology. **Forensic Science International**, v. 121, n. 1–2, p. 116–125, 2001.

LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 2, p. 195–228, 2007.

LANARO, R. et al. Intoxicações intencionais por praguicidas. In: DORTA, D. J. et al. (Eds.). **Toxicologia Forense**. São Paulo: Blucher, 2018. p. 519–541.

LAWAL, A.; TAN, G. H.; ALSHARIF, A. M. A. Recent advances in analysis of pesticides in food and drink samples using LPME techniques coupled to GC-MS and LC-MS: A review. **Journal of AOAC International**, v. 99, n. 6, p. 1383–1394, 2016.

LINDEN, R.; ANTUNES, M. V. Análise Toxicológica Sistemática. In: DORTA, D. J. et al. (Eds.). **Toxicologia Forense**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2018. p. 414–429.

LIU, S.; DASGUPTA, P. K. Liquid Droplet. v. 67, n. 73, p. 2042–2049, 1995.

LIU, Z. et al. Removal of bentazone from micro-polluted water using MIEX resin : Kinetics , equilibrium , and mechanism. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, n. 3, p. 381–387, 2011.

LÓPEZ-LÓPEZ, J. A. et al. Application of solvent-bar micro-extraction for the determination of organic and inorganic compounds. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 110, p. 57–65, 2019.

MADIKIZELA, L. M. et al. Application of hollow fibre-liquid phase microextraction technique for isolation and pre-concentration of pharmaceuticals in water. **Membranes**, v. 10, n. 11, p. 1–25, 2020.

MANOUSHI, N.; SAMANIDOU, V. Green sample preparation of alternative biosamples in forensic toxicology. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 20, n. November 2020, p. 100388, 2021.

MENCK, R. A. et al. Hollow-fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry of barbiturates in whole blood samples. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 23, p. 3361–3368, 2012.

MERIB, J.; CARASEK, E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 4, p. 249–262, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defptohtm.exe?sinannet/cnv/Intoxbr.def>>.

OLIVEIRA, C. D. R. et al. Introdução à toxicologia forense e contexto histórico. In: DORTA, D. J. et al. (Eds.). **Toxicologia Forense**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2018. p. 21–39.

OLIVEIRA, A. R. M. DE et al. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 637–644, 2008.

PEDERSEN-BJERGAARD, S. **Microextraction with supported liquid membranes**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

PEDERSEN-BJERGAARD S, R. K. Liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. **Anal.Chem**, v. 71, n. 14, p. 2650–2656, 1997.

PETERS, F. T. et al. Method Development in Forensic Toxicology. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 36, 2018.

PIERRI, M. E. et al. Multiclass determination of endocrine disruptors in urine by hollow fiber microporous membrane and liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 652, p. 114725, 1 set. 2022.

**PPDB: Pesticide Properties Database**. Disponível em: <<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/atoz.htm#T>>.

PRAGST, F. et al. **UV Spectra of Toxic Compounds: Database of Photodiode Array UV Spectra of Illegal and Therapeutic Drugs, Pesticides, Ecotoxic Substances and Other Poisons**. Berlin : [s.n.]. v. 2

PRAGST, F.; HERZLER, M.; ERXLEBEN, B. T. Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 42, n. 11, p. 1325–1340, 2004.

PROSEN, H. Applications of hollow-fiber and related microextraction techniques for the determination of pesticides in environmental and food samples—a mini review. **Separations**, v. 6, n. 4, p. 1–24, 2019.

**PubChem Database**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>>.

SHARIFI, V.; ABBASI, A.; NOSRATI, A. Application of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid-liquid microextraction techniques in analytical toxicology. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, n. 2, p. 264–276, 2016.

SKOPP, G. Postmortem toxicology. **Forensic Science, Medicine, and Pathology**, v. 6, n. 4, p. 314–325, 2010.

SOARES, S. et al. Organophosphorus pesticide determination in biological specimens: bioanalytical and toxicological aspects. **International Journal of Legal Medicine**, v. 133, n. 6, p. 1763–1784, 2019.

STIMPFL, T. et al. Laboratory Guidelines. **TIAFT-Bulletin**, v. XXXI, n. 4, p. 23–26, 2011.  
UGLAND, H. G.; KROGH, M.; REUBSAET, L. Three-phase liquid-phase microextraction of weakly basic drugs from whole blood. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 798, n. 1, p. 127–135, 2003.

VENSON, R.; KORB, A. S.; COOPER, G. A review of the application of hollow-fiber liquid-phase microextraction in bioanalytical methods – A systematic approach with focus on forensic toxicology. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the**

**Biomedical and Life Sciences**, v. 1108, n. January, p. 32–53, 2019.

VINCENTI, M. et al. Fast screening of 88 pharmaceutical drugs and metabolites in whole blood by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 2–3, p. 863–879, 2013.

WYMAN, J. F. Principles and procedures in forensic toxicology. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 32, n. 3, p. 493–507, 2012.

YAMINI, Y.; REZAZADEH, M.; SEIDI, S. Liquid-phase microextraction – The different principles and configurations. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 112, p. 264–272, 2019.