

Vanessa Simão

**HF-DLLME: UMA NOVA COMBINAÇÃO DAS TÉCNICAS
DE MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA E
MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA COM MEMBRANA
MICROPOROSA PARA DETERMINAÇÃO DE
AFLATOXINAS E AGROTÓXICOS EM SUCOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito obrigatório para obtenção do título de Doutor (a) em Química.

Orientador Prof. Dr.: Eduardo Carasek da Rocha

**Florianópolis
2015.**

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

Simão, Vanessa
HF-DLLME: : UMA NOVA COMBINAÇÃO DAS TÉCNICAS DE
MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA E MICROEXTRAÇÃO
EM FASE LÍQUIDA COM MEMBRANA MICROPOROSA PARA DETERMINAÇÃO
DE AFLATOXINAS E AGROTÓXICOS EM SUCOS / Vanessa Simão ;
orientador, Eduardo Carasek da Rocha - Florianópolis, SC,
2015.
160 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Técnicas modernas de preparo de amostra.
3. Microextração, HF-DLLME, HF-LPME, DLLME. 4. Micotoxinas
e agrotóxicos em alimentos. I. Carasek da Rocha, Eduardo.
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Química. III. Título.

Folha de aprovação da banca

Dedico este trabalho à minha família, o bem mais precioso da minha vida, e em especial a minha mãe Leda, e as minhas avós Leonora Lângaro Nondilo (*in memoriam*) e Carmelina Baldissera Simão.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que desempenharam papel importante para a conclusão deste trabalho.

Primeiramente agradeço a Deus pela força e fé que me foram concedidas para que eu completasse essa jornada.

De forma muito especial, agradeço a minha família pelo amor incondicional, pela compreensão nas horas difíceis, vocês foram e sempre serão, o alicerce da minha vida. Agradeço particularmente a minha mãe **Leda Maria** por todos os sacrifícios que fizestes para que eu tivesse a melhor formação e educação possível. Agradeço ao meu pai **Juares**, pelo exemplo de força e perseverança. Agradeço a minha irmã **Rossana** e meu irmão **Alessandro**, por estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis, pelas caronas de madrugada, pelos risos e lágrimas compartilhadas, e agradeço imensamente a minha pequena sobrinha e afilhada **Maria Eduarda** por me mostrar que a família é tudo na vida e que maior amor no mundo não existe.

Agradeço imensamente ao professor **Eduardo Carasek da Rocha**, pela oportunidade de aprendizado, orientação e incentivo, você foi um exemplo de orientador, professor e amigo. Guardarei no coração com todo carinho essa experiência.

Obrigada a todos os professores do departamento de química da UFSC que contribuíram com minha formação e em especial professores **Gustavo Micke**, **Tatiane de Andrade Maranhão** e **Morgana Frena** que participaram da banca de avaliação da minha tese.

Agradeço as professoras **Isabel Jardim** e **Maria Eugênia Queiroz** que contribuíram imensamente com suas participações na banca de avaliação deste trabalho.

Aos funcionários e amigos **Jadir** e **Grace**, talvez sem vocês eu não tivesse ingressado no curso e me tornado doutora!

Aos colegas e amigos do laboratório de CROMAAS **Nane**, **Renatinha**, **Pati**, **Ligia**, **Cris**, **Giuli**, **Joice**, **Dani**, **Gabi**, **Camila**, **Edinho**, **Ana**, **Jef**, **Vanessinha**, **Nay**, **Mau**, **Murara**, **Morés**, **Andy**, **Helô**, **Daí**, **Ivan**, **Mi**, **Alfredo** (agregado) obrigada pelo companheirismo e pelas risadas infinitas.

Um agradecimento especial aos meus amigos e irmãos de laboratório **Adriana** e **Josias**, que sempre estiveram ao meu lado e compartilharam os desafios, sucessos e fracassos. Obrigada pelo ombro amigo principalmente nos momentos mais difíceis, sem vocês eu não seria quem sou hoje e não teria conseguido! AMO VOCÊS

Aos colegas e amigos do departamento de Química, guardarei

na lembrança as brincadeiras, parcerias, churrascos, aulas, listas de exercícios e seminários compartilhados.

Agradeço a meus amigos e amigas de Florianópolis, Passo Fundo e alguns que estão espalhados pelo mundo, pelos momentos que me retiraram do mundinho fechado que é o doutorado para voltar à realidade e ter vida social.

À Universidade Federal de Santa Catarina, ao Departamento de Química, obrigada pelo espaço e recursos disponibilizados.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a finalização deste trabalho, tenha sido com algo material ou algo espiritual.

RESUMO

Neste trabalho foi proposto, pela primeira vez, a combinação simultânea das técnicas de microextração em fase líquida suportada em fibra oca (HF-LPME) e microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) para aplicação em amostras líquidas. Dois estudos foram desenvolvidos utilizando a metodologia proposta, a qual foi denominada de DLLME suportada com membrana oca (HF-DLLME). O primeiro estudo foi à determinação de aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2) em suco de soja por HPLC-FLD. A principal vantagem desta abordagem foi o uso de pequenas quantidades de solventes orgânicos e a não utilização de solventes clorados. As condições ótimas de extração foram: 1-octanol imobilizado nos poros da fibra oca de polipropileno; tolueno e acetona na proporção 1:5 como solventes extrator e dispersor, respectivamente, volume total da mistura de solventes extrator:dispersor igual a 100 μL , adição de NaCl a 2% do volume da amostra e tempo de extração 60 min. As condições ideais para a dessorção líquida foram de 150 μL de acetonitrila:água (50:50 v/v) e tempo de dessorção de 20 min em banho de ultrassom. A faixa linear variou entre 0,03-21 $\mu\text{g L}^{-1}$, com coeficientes de correlação R^2 variando 0,9940-0,9995. Os limites de detecção e quantificação variaram entre 0,03-0,27 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,1-0,9 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. As recuperações dos analitos variaram entre 72-117% e precisão entre 12 e 18%. O segundo estudo foi a determinação direta de 3 agrotóxicos (parationa metílica, difenoconazol e clorpirifós) em suco de uva e detecção e quantificação por cromatografia líquida acoplada com detector por arranjo de diodos. A condição ideal de extração foi alcançada através do preenchimento dos poros da parede da membrana com dodecanol e usando hexano/acetona como solventes de extração/dispersão. A adição de sal na amostra teve um efeito negativo sobre a eficiência da extração dos analitos e o tempo de extração ótimo foi de 60 min. O volume de hexano/acetona e o pH da amostra foram fatores estudados que não afetaram significativamente o sinal analítico dos compostos nos níveis estudados. Por conseguinte, uma quantidade intermediária destes solventes (250 μL ; 1:7,5 v/v) e pH 6 foram selecionados como condições ótimas de extração. A condição ideal de dessorção foi obtida com acetonitrila como solvente e 10 minutos de tempo de dessorção em banho de ultrassom. A faixa linear de trabalho variou entre 58 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (parationa metílica), 62-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (difenoconazol) e 107-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (clorpirifós), com coeficientes de correlação que variam 0,9980-0,9942. Os limites de detecção e de quantificação encontrados foram, respectivamente, 17 e 58 $\mu\text{g L}^{-1}$ para

parationa metflica, 19 e 62 $\mu\text{g L}^{-1}$ para difenoconazol e 32 e 107 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o clorpirifós. A precisão inter ensaios apresentou valores de desvio padrão relativo entre 3,5 e 11,2%. De acordo com os resultados, a nova combinação das técnicas de HF e DLLME mostrou-se como um procedimento eficiente para a extração de micotoxinas e agrotóxicos em sucos de soja e de uva, respectivamente. A HF-DLLME, comparada com as técnicas tradicionais de preparo de amostra, apresenta-se como uma excelente alternativa para determinação de micotoxinas e agrotóxicos devido a algumas características, tais como: baixo consumo de solvente orgânico, não uso de solventes clorados, não necessidade de centrifugação, baixo custo e fácil aplicação. Apesar de a HF-DLLME apresentar tempo de análise longo (70-90 min.) ela permite a extração simultânea de amostras, aumentando a frequência analítica da técnica. Além disso, esta nova técnica tem um grande potencial para uso em sistemas automatizados como *Well Blade 96* o que acarretaria menor tempo de análise para uma amostra (1-2 min.).

Palavras-chave: Microextração líquida suportada em fibra oca. Microextração líquido-líquido dispersiva. Suco de soja. Suco de uva. Aflatoxinas. Agrotóxicos. Preparo de amostra.

ABSTRACT

This work was proposed for the first time, developing a sample preparation method based on simultaneous combination of techniques between hollow-fiber-supported liquid membrane (HF-LPME) and dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) for direct application in liquid matrices. Two studies were developed, first to determination of aflatoxins (AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2) in soybean juice by HPLC-FLD. The main advantage of this approach is the use of non-chlorinated solvent and small amounts of organic solvents. The optimum extraction conditions were 1-octanol as immobilized solvent; toluene and acetone at 1:5 ratio as extraction and disperser solvents (100 μL), NaCl at 2% of the sample volume and extraction time of 60 min. The optimal condition for the liquid desorption was 150 μL acetonitrile:water (50:50 v/v) and desorption time of 20 min. The linear range varied from 0.03 to 21 $\mu\text{g L}^{-1}$, with R2 coefficients ranging from 0.9940 to 0.9995. The limits of detection and quantification ranged from 0.01 $\mu\text{g L}^{-1}$ to 0.03 $\mu\text{g L}^{-1}$ and from 0.03 $\mu\text{g L}^{-1}$ to 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Recovery tests ranged from 72 to 117% and accuracy between 12 and 18%. The second study was determination of 3 pesticides directly in grape juice, using HF-DLLME method and detection and quantification were performed by liquid chromatography with diode array detection. The optimum extraction condition was reached by filling the pores of the membrane wall with dodecanol and using hexane/acetone as extraction/dispersion solvents. Salt addition had a highly negative effect on the extraction efficiency and the optimum extraction time was 60 min. The volume of hexane/acetone mixture and the sample pH did not affect the signal at the levels studied. Therefore, an intermediate amount of these solvents (250 μL ; 1:7.5 v/v) and pH 6 were selected. The optimum desorption condition was obtained with acetonitrile and 10 min of desorption time. The linear working range varied from 58 to 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (parathion-methyl), 62–500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (difenoconazole) and 107–500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (chlorpyrifos), with correlation coefficients ranging from 0.9980–0.9942. The limits of detection and quantification found were, respectively, 17 and 58 $\mu\text{g L}^{-1}$ for parathion-methyl, 19 and 62 $\mu\text{g L}^{-1}$ for difenoconazole and 32 and 107 $\mu\text{g L}^{-1}$ for chlorpyrifos. The relative standard deviation ranged between 3.5 and 11.2%. According to results, the new combination of HF and DLLME procedure presented efficient data for extraction of mycotoxins and pesticides in soybean and fruit juices, respectively. The HF-DLLME is an excellent alternative due to some characteristics such as low organic solvent consumption, no use of

chlorinate solvents, centrifugation is not required, low cost and easy application. Furthermore, this new technique has great potential for use in automated systems.

Keywords: hollow fiber supported liquid membrane, dispersive liquid-liquid microextraction, soybean juice, grape juice, aflatoxins, pesticides, sample preparation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas envolvidas para o procedimento de SPE	29
Figura 2. Principais configurações das classes de LPME	33
Figura 3. Esquema dos modos de extração utilizados em HF-LPME. (A) Modo bifásico (B) Modo trifásico.....	37
Figura 4. Diferentes configurações para HF-LPME, configuração em forma de U (A), configuração em forma de haste (“rod-like”) (B) e modo em serpentina (C).....	38
Figura 5. Diagrama simplificado demonstrando a injeção da mistura dos solventes na amostra, a dispersão do solvente extrator na amostra e a partição do analito entre a amostra e o solvente extrator.	54
Figura 6. Reação de derivatização das Aflatoxinas B1 e G1 com ácido trifluoroacético	70
Figura 7. Diagrama esquemático do procedimento de extração de aflatoxinas em suco de soja.....	81
Figura 8. Otimização do solvente de recobrimento utilizado para imobilização dos poros da fibra oca da técnica de HF-DLLME. Condições de extração: amostra aquosa contendo $16 \mu\text{g L}^{-1}$ para AFB1 (■) e AFG1(■) e $5 \mu\text{g L}^{-1}$ para AFB2(■) and AFG2(■), tempo de extração 30 min.	89
Figura 9. Otimização do sistema de solventes extrator/dispersor. Condições de extração: amostra aquosa contendo $16 \mu\text{g L}^{-1}$ para AFB1 (■) e AFG1(■) e $5 \mu\text{g L}^{-1}$ para AFB2(■) e AFG2(■), tempo de extração 30 min., volume total de $150 \mu\text{L}$ de mistura extrator/dispersor, octanol imobilizado nos poros da parede da fibra oca de polipropileno	90
Figura 10. Otimização da proporção entre solvente extrator:dispersor. Condições de extração: amostra aquosa contendo $16 \mu\text{g L}^{-1}$ para AFB1 (■) e AFG1(■) e $5 \mu\text{g L}^{-1}$ para AFB2(■) e AFG2(■), tempo de extração 30 min., volume total de $150 \mu\text{L}$ de mistura tolueno/acetona, octanol imobilizado nos poros da parede da fibra oca de polipropileno	91
Figura 11. Otimização do sistema de solventes e tempo para dessorção das Aflatoxinas em suco de soja. Superfície triangular (A) obtido para o sistema de solventes de dessorção e gráfico de barras(B) para tempo de dessorção.	92
Figura 12. Superfícies de resposta obtidas para a condição compromisso das AFLs a partir do planejamento composto central para otimização das variáveis, tempo de extração, adição de NaCl, e volume do sistema de solvente extrator/dispersor. (6A) Variáveis tempo <i>versus</i> adição de NaCl; (6B) Variáveis tempo <i>versus</i> volume de solvente extrator/dispersor; (6C) Variáveis volume de solvente extrator/dispersor <i>versus</i> adição de NaCl;...	95
Figura 13. Teste de exaustividade da técnica de HF-DLLME para determinação de AFLs em suco de soja.	97
Figura 14. Eficiência de extração de AFLs em suco de soja para cada	

técnica de microextração comparada neste trabalho	98
Figura 15. Cromatogramas obtidos utilizando o procedimento de HF-DLLME para extração de AFLs em amostras de suco de soja fortificada e não fortificada e posterior detecção por HPLC-FD.....	107
Figura 16. Representação esquemática das etapas do procedimento proposto para a microextração HF-DLLME com membrana porosa de polipropileno.	115
Figura 17. Cromatograma obtido por HPLC-DAD usando uma mistura de solução padrão de 10 mg L ⁻¹ dos agrotóxicos: Parationa metílica (pico 1), Difenconazol (pico 2) e Clorpirifós (pico 3).	118
Figura 18. Estudo dos efeitos do recobrimento da membrana no uso da microextração líquido-líquido dispersiva para extração dos agrotóxicos parationa metílica (■) difenoconazol (■) e clorpirifós (■) em suco de uva, seguida da detecção por HPLC-DAD.....	119
Figura 19. Estudo do tipo de solvente e tempo de dessorção dos analitos após extração por HF-DLLME, seguido por análise por HPLC-DAD. Agrotóxicos: parationa metílica (■) difenoconazol (■) e clorpirifós (■)...	120
Figura 20. Estudo do efeito do tipo de solvente orgânico utilizado para o recobrimento da membrana para extração dos agrotóxicos parationa metílica (■) difenoconazol (■) e clorpirifós (■) em suco de uva, pela técnica de HF-DLLME, seguida por detecção em HPLC-DAD.....	122
Figura 21. Estudo da influência da mistura de solventes extrator/dispersor na eficiência de extração dos agrotóxicos parationa metílica (■) difenoconazol (■) e clorpirifós (■) em suco de uva, usando a técnica de HF-DLLME e detecção por HPLC-DAD.	123
Figura 22. Diagrama de Pareto obtido através do planejamento fatorial fracionado para otimização das variáveis e suas interações para análise de agrotóxicos em suco de uva utilizando HF-DLLME e detecção por HPLC-DAD.	125
Figura 23. Otimização do tempo de extração para extração dos agrotóxicos parationa metílica (■) difenoconazol (■) e clorpirifós (■) em suco de uva usando HF-DLLME e detecção por HPLC-DAD.	127
Figura 24. Cromatogramas de suco de uva fortificado com os três agrotóxicos (277 µg L ⁻¹) detectados por HPLC-DAD. Registros realizados em 235 nm para difenoconazol (15,9 min), 273 nm para parationa metílica (14,6 min) e 289 nm para clorpirifós (17,5 min)	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos trabalhos encontrados referentes ao uso da técnica de HF-LPME para análise de agrotóxicos e micotoxinas em alimentos detectados por cromatografia líquida	51
Tabela 2. Resumo dos trabalhos encontrados referentes ao uso da técnica de DLLME para análise de agrotóxicos e micotoxinas em alimentos detectados por cromatografia líquida.....	61
Tabela 3. Principais configurações e combinações de técnicas de extração e preparo de amostra com DLLME encontradas na literatura	67
Algumas características físico-químicas, espectrais e estruturais podem ser observadas na Tabela 4.	69
Tabela 4. Características físico-químicas e espectrais das 4 aflatoxinas estudadas	69
Tabela 5. Características físico-químicas dos agrotóxicos estudados	75
Tabela 6. Variáveis, níveis, matriz para o planejamento composto central com ponto central em triplicata na extração de AFLs em suco de soja por HF-DLLME e detecção por HPLC-FLD	84
Tabela 7. Planejamento composto central e respostas obtidas para o procedimento de HF-DLLME para determinação de AFLs em sucos de soja	94
Tabela 8. Resultados obtidos por meio da análise de variância simples (ANOVA - <i>one way</i>) das variáveis significativas para o procedimento de HF-DLLME na determinação de AFLs em suco de soja	94
Tabela 9. Comparação entre métodos utilizados para extração/limpeza de aflatoxinas em matrizes complexas.....	101
Tabela 10. Alguns parâmetros analíticos obtidos para técnica de HF-DLLME em amostras de suco de soja.....	105
Tabela 11. Recuperação em três níveis da curva analítica, precisão intradia (repetibilidade) e precisão intermediária (interdia) para o primeiro nível.	106
Tabela 12. Valores de comprimento de onda de absorção máxima e tempo de retenção para cada agrotóxico	118
Tabela 13. Níveis, variáveis, matriz e a resposta obtida para o planejamento fatorial fracionado $2^{5-1} + C$ na extração de agrotóxicos por HF-DLLME e detecção por HPLC-DAD	124
Tabela 14. Resultados obtidos por meio da análise de variância simples (ANOVA - <i>one way</i>) das variáveis significativas para o procedimento de HF-DLLME na determinação de agrotóxicos em suco de uva.	126
Tabela 15. Figuras de mérito para determinação de agrotóxicos em suco de uva utilizando HF-DLLME e detecção por HPLC-DAD.....	128
Tabela 16. Comparação do método proposto de HF-DLLME com outras técnicas de pré-concentração para determinação dos agrotóxicos estudados.	130

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

[BBIM][PF6], 1,3-dibutilimidazolio hexafluorofosfato;
[BMIM][PF6], 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato;
[HMIM][PF6] – 1-hexil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato;
[HMIM][Tf2N] – 1-hexil-3-metilimidazolio
bis(trifluormetilsulfonyl)imida;
[HPy][PF6] – 1-hexilpiridínio hexafluorofosfato;
AFLs – Aflatoxinas
AFB1 – Aflatoxina B1
AFB2 – Aflatoxina B2
AFG1 – Aflatoxina G1
AFG2 – Aflatoxina G2
APCI – Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*;
C18-LC – Cromatografia Líquida de Fase Reversa, do inglês *Reversed-Phase Liquid Chromatography*;
CE – Eletroforese Capilar do inglês *Capillary Electrophoresis*;
CTAB – Brometo de N-cetil-N-N-N-trimetil amônio;
DAD – Detector por Arranjo de Diodos, do inglês *Diode Array Detection*;
DI – Imersão Direta, do inglês *Direct Immersion*;
DLLME – Microextração Líquido-Líquido Dispersiva, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*;
DMSPE – Extração Dispersiva em Fase Micro-Sólida, do inglês *Dispersive Micro Solid-Phase Extraction*;
DSPE – Extração Dispersiva em Fase Sólida, do inglês *Dispersive Solid-Phase Extraction*;
EI – Impacto de Elétrons, do inglês *Electron Impact Ionization*;
EME – Extração por Eletromembrana, do inglês *Electromembrane Extraction*;
ESI – Ionização por *Eletrospray*, do inglês *Electrospray Ionization*;
FID – Detector por Ionização em Chama, do inglês *Flame Ionization Detector*;
FLD – Detector de Fluorescência do inglês *Fluorescence Detector*;
FPD – Detector Fotométrico por Chama, do inglês *Flame Photometric Detector*;
GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*;
GC-ECD – Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector de Captura de Elétrons, do inglês *Electron Capture Detector*;
GC-MS - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas,

do inglês *Gas Chromatography with Mass Spectrometry*;
GC-MS/MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial, do inglês *Gas Chromatography with Mass Spectrometry in tandem*;
HF-LPME – Microextração em Fase Líquida com Fibra Oca, do inglês *Hollow-Fiber Liquid-Phase Microextraction*;
HFRLM – Membrana Líquida Renovável Suportada em Fibra Oca, do inglês *Hollow-Fiber Renewal Liquid Membrane*;
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*;
HPLC-DAD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Arranjo de Diodos, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection*;
HS - do inglês *Headspace*;
IAC – Coluna de Imunoafinidade, do inglês *Immunoaffinity Column*;
IL – Líquidos Iônicos, do inglês *Ionic Liquid*;
IT – Armadilha de íons, do inglês *Ion Trap*;
LC – Cromatografia líquida, do inglês *Liquid Chromatography*;
LC-MS/MS – Cromatografia Líquida com detecção por Espectrometria de Massas Sequencial, do inglês *Liquid Chromatography with Mass Spectrometry in tandem*;
LIF – Fluorescência Induzida por Laser, do inglês *Laser-Induced Fluorescence*;
LLE – Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*;
LLLME – Microextração Líquido-Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid-Liquid Microextraction*;
LOD – Limite de detecção, do inglês *Limit Of Detection*;
LOQ – Limite de quantificação, do inglês *Limit Of Quantification*;
LPME – Microextração em fase líquida, do inglês *Liquid-Phase Microextraction*;
MAE – Extração Assitida por Micro-ondas, do inglês *Microwave-Assisted Extraction*;
MeCN – Acetonitrila;
MEKC – Cromatografia Eletrocínética Micelar, do inglês *Micellar Electrokinetic Chromatography*;
MeOH – Metanol;
MIP – Polímero Molecularmente Impresso, do inglês *Molecularly Imprinted Polymer*;
MMLLE – Extração Líquido-Líquido em Membrana Microporosa, do inglês *Microporous Membrane Liquid-Liquid Extraction*;
MS – Espectrômetro de Massas, do inglês *Mass Spectrometer*;

MSPD – Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês *Matrix Solid-Phase Dispersion*;

NPD – Detector de Nitrogênio e Fósforo, do inglês *Nitrogen-Phosphorus Detector*;

PP – Polipropileno;

PSA – Amina primária/secundária, do inglês *Primary/Secondary Amine*;

QuEChERS – Extração Rápida, Fácil, Barata, Efetiva, Robusta e Segura, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*;

R(%) - Recuperação;

RSD(%) – Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*;

SDME – Microextração em Gota Única, do inglês *Single-Drop Microextraction*;

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio, do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*;

SFE – Extração com Fluido Supercrítico, do inglês *Supercritical Fluid Extraction*;

SFO – Gota Orgânica Flutuante Solidificada, do inglês *Solidification Of The Floating Organic Drop*;

SI – Injeção lenta, do inglês *Slow Injection*;

SIM – Monitoramento por Seleção de Íon, do inglês *Selected Ion Monitoring*;

SLM – Membrana Líquida Suportada, do inglês *Supported Liquid Membrane*;

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

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

TC – Temperatura Controlada, do inglês *Temperature Controlled*;

TFA – Ácido trifluoracético

TFAA – Anidrido trifluoracético;

TLC – Cromatografia em Camada Delgada, do inglês *Thin-Layer Chromatography*;

TOF – Tempo de Voo, do inglês *Time Of Flight*;

UA-DLLME – Microextração Líquid-Líquido Dispersiva Assistida por Ultrassom, do inglês *Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*;

UHPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência, do inglês *Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*;

USAEME – Microextração por Emulsificação Assistida por Ultrassom, do inglês *Ultrasound-Assisted Emulsification Microextraction*;

UV – Ultravioleta, do inglês *Ultraviolet*;

VA – Extração Assitida por Vortex, do inglês *Vortex Assisted*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1 TÉCNICAS TRADICIONAIS OU CLÁSSICAS DE PREPARO DE AMOSTRA	27
2.1.1 Extração Líquido-Líquido (LLE)	27
2.1.2 Extração sólido-líquido (SLE).....	28
2.1.3 Extração em fase sólida (SPE).....	29
2.1.4 Extração por Fluido Supercrítico (SFE)	30
2.2 TÉCNICAS MODERNAS DE PREPARO DE AMOSTRA	32
2.2.1 Microextração em fase líquida (LPME)	32
2.2.2 Microextração em gota única (SDME).....	34
2.2.3 Microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME)	36
2.2.3.1 <i>Princípios e Fundamentos da técnica de HF-LPME</i>	41
2.2.3.2 <i>Parâmetros que afetam e devem ser otimizados na extração em HF-LPME</i>	45
2.2.3.2.1 <i>Escolha da membrana</i>	45
2.2.3.2.2 <i>Solvente orgânico</i>	46
2.2.3.2.3 <i>Tempo de extração</i>	46
2.2.3.2.4 <i>Ajuste do pH</i>	47
2.2.3.2.5 <i>Agitação da amostra</i>	48
2.2.3.2.6 <i>Razão dos volumes de solução da fase doadora e fase receptora</i>	48
2.2.3.2.7 <i>Aditivos na fase doadora</i>	48
2.2.3.3 <i>Aplicações da técnica de HF-LPME para análise de agrotóxicos e micotoxinas em alimentos</i>	49
2.2.4 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).....	53
2.2.4.1 <i>Princípios e Fundamentos da técnica de DLLME</i>	55
2.2.4.2 <i>Parâmetros que afetam e devem ser otimizados na extração por DLLME</i>	57
2.2.4.2.1 <i>Seleção do solvente de extração</i>	57
2.2.4.2.2 <i>Volume de solvente extrator e dispersor ou razão entre os volumes</i>	57
2.2.4.3 <i>Alternativas que podem auxiliar na eficiência da técnica de DLLME</i>	58
2.2.4.4 <i>Aplicações da técnica de DLLME para análise de agrotóxicos e micotoxinas em alimentos</i>	60
2.3 ANALITOS ESTUDADOS	68
2.3.1 Aflatoxinas (AFLs)	68
2.3.2 Agrotóxicos	72

2.3.2.1 Organofosforados.....	73
2.3.2.2 Triazóis	74
3 OBJETIVOS.....	77
3.1 OBJETIVO GERAL	77
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	77
4 DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO PROCEDIMENTO ANALÍTICO COMBINANDO MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDA SUPORTADA EM FIBRA OCA E MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA PARA DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS EM SUCO DE SOJA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO DETECTOR DE FLUORESCÊNCIA	79
4.1 MATERIAL E MÉTODOS	79
4.1.1 Químicos e reagentes	79
4.1.2 Outros materiais.....	80
4.1.3 Instrumentação	80
4.1.4 Procedimentos	80
4.1.4.1 <i>Preparo das amostras de suco de soja e procedimento de HF-DLLME para determinação de AFLs.....</i>	<i>81</i>
4.1.4.2 <i>Otimizações.....</i>	<i>82</i>
4.1.4.3 <i>Procedimento otimizado de extração para análise de AFLs.....</i>	<i>85</i>
4.1.4.4 <i>Procedimento otimizado de derivatização, dessorção e injeção dos analitos.....</i>	<i>86</i>
4.1.4.5 <i>Curva analítica e figuras de mérito ou parâmetros analíticos</i>	<i>86</i>
4.1.4.6 <i>Análise estatística.....</i>	<i>87</i>
4.1.5 Comparação da eficiência das técnicas estudadas	87
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
4.2.1 Otimização do solvente de recobrimento para os poros da parede da membrana.....	88
4.2.2 Otimização da mistura de solvente extrator e dispersor adicionado às amostras aquosas	89
4.2.3 Otimização da razão entre os solventes extrator e dispersor	91
4.2.4 Otimização do tempo e sistema de solventes para dessorção dos analitos	92
4.2.5 Otimização multivariada.....	93
4.2.6 Comparação entre a eficiência de extração da técnica de HF-DLLME com outras técnicas	97
4.2.7 Parâmetros analíticos	105
4.3 CONCLUSÕES PARCIAIS	108
5 COMBINAÇÃO DE MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDA SUPORTADA EM FIBRA OCA E MICROEXTRAÇÃO	

LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA COMO UMA TÉCNICA RÁPIDA E SENSÍVEL PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE SUCO DE UVA, SEGUIDA DE DETERMINAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	110
5.1 MATERIAL E MÉTODOS	110
5.1.1 Químicos e reagentes.....	110
5.1.2 Outros materiais.....	111
5.1.3 Instrumentação.....	111
5.1.4 Procedimentos.....	111
5.1.4.1 <i>Preparo das amostras de suco de uva</i>	112
5.1.4.2 <i>Otimizações</i>	112
5.1.4.3 <i>Procedimento otimizado para extração dos 3 agrotóxicos por HF-DLLME em suco de uva</i>	115
5.1.4.4 <i>Procedimento otimizado para dessorção dos 3 agrotóxicos e injeção dos analitos</i>	116
5.1.4.5 <i>Curva analítica e parâmetros analíticos de mérito</i>	116
5.1.4.6 <i>Análise estatística</i>	117
5.1.5 Comparação do método de HF-DLLME com outras técnicas de preparo de amostras.....	117
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	117
5.2.1 Otimização dos parâmetros que afetam extração dos agrotóxicos em amostra de suco de uva utilizando a metodologia de HF-DLLME	119
5.2.1.1 <i>Seleção do modo de microextração</i>	119
5.2.1.2 <i>Seleção do solvente e tempo para dessorção dos analitos da membrana</i>	120
5.2.1.3 <i>Seleção do solvente orgânico para recobrimento dos poros da membrana</i>	121
5.2.1.4 <i>Seleção da mistura de solventes extrator/dispersor</i>	122
5.2.1.5 <i>Otimização multivariada</i>	124
5.2.2 <i>Curva analítica e parâmetros analíticos de mérito</i>	127
5.2.3 <i>Análise de amostras de suco de uva integral</i>	128
5.2.4 <i>Comparação do método de HF-DLLME com outros métodos de concentração de amostras</i>	130
5.3 CONCLUSÕES PARCIAIS	131
6 CONCLUSÃO	133
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135

1 INTRODUÇÃO

A química de alimentos, atualmente, é um dos campos mais importante da ciência, isso se deve ao aumento da demanda por alimentos, decorrente do crescimento da população mundial. Neste contexto, a produção de alimentos em grandes quantidades, com variedade e qualidade são requisitos exigidos pelo mercado consumidor. Desta forma, a segurança alimentar tem propiciado a expansão de estudos referentes à análise de contaminantes em matrizes alimentares.

O uso indiscriminado de agrotóxicos no Brasil, decorrente da não utilização racional desses produtos e também devido a uma legislação permissiva, tem colocado a saúde dos brasileiros e povos de outras nacionalidades em risco, uma vez que o Brasil é o maior consumidor mundial desses produtos e também um grande exportador de grãos e alimentos. Além disso, a não utilização de boas práticas de produção e armazenamentos dos alimentos, pode prejudicar a qualidade dos produtos, e gerar contaminações por agentes químicos (resíduos de agrotóxicos, metais pesados); toxinas (produzidas por bactérias - enterotoxinas e fungos - micotoxinas), além de microrganismos (bactérias e fungos - patogênicos e/ou toxigênicos). Desta forma, a análise de alimentos tem papel fundamental para segurança alimentar e promoção da saúde coletiva.

O desenvolvimento de metodologias analíticas que avaliem a qualidade e a segurança dos alimentos é um importante campo de pesquisa. Cabe ressaltar que umas das etapas mais importantes para análise de contaminantes alimentares em matrizes complexas é o preparo da amostra.

O preparo de amostras consiste em um procedimento utilizado por laboratoristas com o objetivo de permitir que amostras complexas sejam analisadas para contaminantes em níveis traço, sem que haja prejuízo analítico por interferências de compostos presentes na matriz ou ainda alguma incompatibilidade instrumental. É importante ressaltar que mesmo com os grandes avanços na instrumentação analítica, existe uma grande preocupação no desenvolvimento e melhoria dos métodos de preparo de amostra, de forma que se preconiza a utilização de métodos que obedeçam aos preceitos da química verde. Nesse sentido, a tendência para as técnicas de extração e limpeza de amostras é a simplificação, miniaturização e automatização, uma vez que esses procedimentos permitiriam a redução do uso de solventes orgânicos tóxicos e o desenvolvimento de processos menos agressivos ao meio

ambiente, porém, mantendo-se a eficiência de extração.

Cabe ressaltar que o procedimento para o preparo da amostra deve sempre procurar reduzir o número de etapas analíticas, diminuindo o tempo de análise, as quantidades de solventes e de substâncias interferentes, sem acarretar em elevação do custo da análise. Portanto, é verdadeiro afirmar que a etapa de preparo de amostras é essencial para o sucesso de qualquer método analítico, sendo que esse procedimento é dependente das características do analito e da matriz, exigindo assim uma otimização adequada das variáveis que influenciam significativamente esse processo.

A busca pelo aprimoramento das técnicas tradicionais de preparo de amostra deveu-se, principalmente, às desvantagens que essas apresentam como: muitas etapas de trabalho manual, o que despense de muito tempo e atenção dos laboratoristas, a utilização de grandes quantidades de solventes orgânicos e limitação nos fatores de pré-concentração. Desta forma, as técnicas modernas de preparo de amostra têm por objetivo a simplificação das etapas analíticas, miniaturização e automação dos sistemas e aumento da seletividade das técnicas, com intuito de praticar alguns dos princípios da química verde.

Neste contexto, a modernização das técnicas de preparo de amostra tornou-se imprescindível e, desta forma, nos últimos 25 anos muitos métodos de preparo de amostra miniaturizados têm sido desenvolvidos. Neste trabalho, foi desenvolvido um novo procedimento de preparo de amostra, para análise de aflatoxinas e agrotóxicos em sucos de soja e uva, respectivamente, o qual se baseou nas técnicas de microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME, do inglês *Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction*) e na microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Com o objetivo de fundamentar teoricamente esse trabalho e fazer um levantamento bibliográfico dos principais avanços no desenvolvimento dos procedimentos de preparo de amostra, foi realizada uma revisão da literatura quanto aos temas que abrangeram desde as técnicas tradicionais de preparo de amostra até as técnicas modernas de microextração em fase líquida, assunto esse foco da presente pesquisa.

2.1 TÉCNICAS TRADICIONAIS OU CLÁSSICAS DE PREPARO DE AMOSTRA

Uma grande variedade de técnicas de preparo de amostras, as quais objetivam a extração de compostos de interesse e conjuntamente a retirada de interferentes (limpeza do extrato) tem sido desenvolvida. A escolha da técnica depende de vários fatores, tais como o tipo de matriz, propriedades físico-químicas do analito e o método separação/detecção a ser utilizado. Algumas dessas técnicas são bem reconhecidas e são denominadas de técnicas tradicionais ou clássicas de preparo de amostras, e são esses procedimentos que serão abordados, brevemente a seguir.

2.1.1 Extração Líquido-Líquido (LLE)

O princípio da extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid-liquid extraction*) baseia-se na partição de uma amostra entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa). A eficiência da extração depende da afinidade dos analitos pelo solvente de extração, além da razão entre as fases orgânica e aquosa e do número de extrações realizadas. Para alguns sistemas, o valor da constante de distribuição, KD, entre as fases pode ser aumentado de acordo com algumas estratégias como: pelo ajuste do pH, para prevenção da ionização de ácidos ou bases, pela formação de par iônico com solutos ionizáveis, pela formação de complexos lipofílicos com íons metálicos ou pela adição de sais neutros, para diminuir a solubilidade de compostos orgânicos na fase aquosa (RIDGWAY; LALLJIE; SMITH, 2007).

Dentre as principais vantagens da técnica de LLE, destacam-se: simplicidade de materiais e procedimentos utilizados; inúmeros solventes podem ser empregados, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Em contrapartida, algumas desvantagens devem ser consideradas para a LLE, entre elas: a presença de analitos hidrofílicos, os quais não podem ser parcialmente extraídos pelo solvente orgânico, resultando em perda de eficiência; impurezas do solvente são concentradas junto com a amostra, implicando no uso de solventes ultrapuros; pode ocorrer formação de emulsões, o que resulta em grande consumo de tempo; volumes relativamente grandes de amostras e de solventes são requeridos, gerando problemas de descartes; alguns solventes orgânicos são tóxicos; pode ocorrer adsorção dos analitos na vidraria; decomposição de compostos instáveis termicamente, na etapa de pré-concentração; o processo é suscetível a erros e, relativamente, de difícil automação (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Mesmo com as várias desvantagens listadas anteriormente, a LLE ainda é muito utilizada em análises de diversos agrotóxicos e micotoxinas em alimentos, uma vez que pode gerar extratos seletivos e com taxa de enriquecimento satisfatória.

2.1.2 Extração sólido-líquido (SLE)

Em se tratando de matriz sólida, como é o caso de grande parte dos alimentos, a etapa de preparo de amostra é imprescindível. Esse procedimento pode-se adequar tanto à transferência do analito para um meio físico compatível com o cromatógrafo, como já citado anteriormente, quanto adequar à concentração dos analitos para que fiquem dentro da faixa linear do equipamento de trabalho, ou ainda ambos (LANÇAS, 2004).

A extração sólido-líquido (SLE, do inglês *solid-liquid extraction*) é a técnica mais antiga de preparo de amostras utilizando solventes, porém é um dos métodos mais frequentemente utilizado na extração de contaminantes alimentares, como agrotóxicos, a partir de grãos de cereais, alimentos e outros materiais sólidos. Esta técnica de preparo de amostra, geralmente, é combinada tanto para transferir os analitos de uma matriz sólida para um extrato em meio líquido, como para retirar materiais particulados e outros tipos de interferentes que possam impedir ou dificultar a análise (PEREIRA; FERNANDES; CUNHA, 2014).

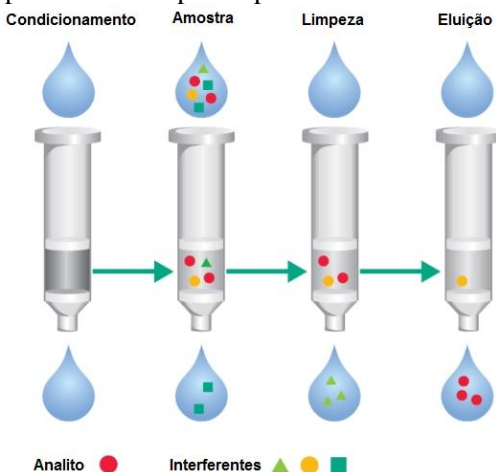
Cabe ressaltar que, geralmente, após esse procedimento de extração, é necessário acrescentar uma etapa de limpeza da amostra, uma vez que a técnica não é seletiva, e, dependendo dos analitos, uma etapa de derivatização pode ser requerida para aumentar a detectabilidade da técnica (KOS; KRŠKA, 2006).

2.1.3 Extração em fase sólida (SPE)

A extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) é uma técnica de extração/limpeza e/ou pré-concentração, e tem sido empregada em substituição às técnicas anteriores mencionadas. Ela é uma das ferramentas mais poderosas e mais empregadas para a extração de analitos presentes em matrizes complexas e está baseada na separação dos analitos pela sua retenção em cartuchos recheados com sorventes, sendo que os mecanismos de retenção são idênticos àqueles envolvidos em cromatografia líquida em coluna (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

O procedimento de SPE, geralmente, envolve 4 etapas: ativação do sorvente para deixar os sítios ativos disponíveis e condicionamento do sorvente com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra; introdução da amostra, para a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes; limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito; eluição e coleta do analito. Na Figura 1 são ilustradas as 4 etapas envolvidas na extração em fase sólida. Muitos sorventes têm sido utilizados para retenção de analitos entre eles: carvão ativado, alumina, sílica gel, silicato de magnésio (Florisil), fases quimicamente ligadas (C_8 , C_{18} , $-NH^{4+}$) e polímeros, por exemplo, o copolímero de estireno entrecruzado com divinilbenzeno (KOS; KRŠKA, 2006).

Figura 1. Etapas envolvidas para o procedimento de SPE



Fonte: Gilson UK (2011).

Entre as evoluções da técnica de SPE, principalmente no que diz respeito à análise de agrotóxicos e micotoxinas, está o desenvolvimento de colunas de imunoafinidade (IACs). Estas colunas são compostas por um suporte ativado de fase sólida, no qual se ligam os anticorpos específicos para os analitos. Essas colunas são muito específicas, uma vez que as moléculas dos analitos ficam aderidas aos anticorpos monoclonais ativos, por meio de interações antígeno-anticorpo (ŞENYUVA; GILBERT, 2010).

De acordo com Pereira, Fernandes e Cunha (2014), a tendência atual para a etapa de limpeza dos extratos é o uso de IACs, pois estas melhoram a detectabilidade do método. Porém, como desvantagem está o custo das IACs e o fato de não serem reutilizáveis de acordo com fabricantes.

2.1.4 Extração por Fluido Supercrítico (SFE)

A extração por fluido supercrítico (SFE, do inglês *supercritical fluid extraction*) é um processo através do qual analitos são extraídos de uma amostra, utilizando como solvente extrator um fluido supercrítico (PEREIRA; FERNANDES; CUNHA, 2014). Desta forma, o fluido supercrítico é o estado da matéria acima da temperatura e da pressão crítica onde o vapor e o líquido têm a mesma densidade e o fluido não pode ser liquefeito pelo simples aumento da pressão. Dentro de uma variedade de fluidos supercríticos, o CO₂ é o solvente de extração mais comum, pois não é caro, é relativamente não-tóxico, não-inflamável, tem, comparativamente a outros fluidos, baixa temperatura crítica, 31,3 °C, e pressão crítica, 7,4 MPa, além de ser facilmente removido após a extração (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Para Ridgway, Lalljie e Smith (2007), a escolha de um fluido supercrítico, como um solvente de extração permite uma extração mais seletiva, e fornece uma cinética de extração mais rápida do que a maioria dos líquidos. O poder de solvatação do fluido pode ser manipulado pela alteração da pressão e/ou temperatura e pela adição de modificadores. No entanto, a adição de outros solventes, tais como metanol, para o fluido supercrítico diminui a seletividade do método. O uso de fluidos supercríticos para solvatação de analitos polares é limitada, e embora a utilização de modificadores tais como metanol, etanol ou acetona, possam diminuir a seletividade da técnica, nesse caso, eles aumentam a eficiência de extração destes compostos polares (PEREIRA; FERNANDES; CUNHA, 2014).

Comparados com solventes líquidos, os fluidos supercríticos têm

viscosidades mais baixas e maiores coeficientes de difusão de solutos, alto poder de solvatação que facilita a transferência de massa durante a extração (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Além disso, essas características permitem a utilização de pequenos volumes de solventes, mantendo a eficiência de extração e limpeza em uma única etapa (KOU; MITRA, 2003).

A técnica de SFE pode ser aplicada para análise de amostras sólidas, semissólidas ou líquidas, porém a análise em amostras úmidas e líquidas pode ser dificultada. Portanto, o método funciona melhor para amostras sólidas em pó fino com boa permeabilidade, tais como solos e plantas secas, além disso, amostras com alto teor de lipídios podem interferir na extração dos analitos (RIDGWAY; LALLJIE; SMITH, 2007).

Dentre as vantagens que a técnica permite está a eliminação do tempo gasto com a remoção de solventes, a não utilização de solventes orgânicos, que são normalmente tóxicos, diminuindo assim os riscos de manipulação e a remoção fácil do fluido supercrítico da amostra após a extração (redução da pressão). Entretanto, as desvantagens são que o analito deve ser solúvel no fluido supercrítico, o que pode ser contornado através da adição de aditivos no eluente (p. ex. adição de solvente para aumentar solubilidade dos analitos), e que a etapa de remoção do analito da amostra pelo fluido supercrítico é a etapa mais problemática do processo (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

De acordo com Pereira, Fernandes e Cunha, (2014), embora a SFE seja uma técnica rápida, possui várias limitações, particularmente no caso de análise de compostos polares, o que têm impedido a sua aplicação generalizada. Além disso, SFE é um método que requer o uso de equipamentos caros e está caindo em desuso para a extração de analitos orgânicos em concentrações traço, sendo substituído por técnicas mais baratas e que não necessitem desses aparatos. Além disso, os autores acreditam que a técnica de SFE não ganhou popularidade, provavelmente, devido a dificuldades na otimização do método para o uso rotineiro, assim como a necessidade de investir em equipamento especial.

Cabe ressaltar, que à medida que novos protocolos de extração/limpeza e pré-concentração são desenvolvidos para os métodos cromatográficos, os limites de detecção e quantificação para diferentes analitos podem ser reduzidos. Aliado a isso, o volume de solvente orgânico necessário nessas técnicas é um aspecto preocupante, devido ao custo e problemas de poluição ambiental. Considerando que o preparo de amostra é normalmente a etapa que consome mais tempo e

gera maior erro na análise instrumental, estudos são realizados com o intuito de se desenvolver métodos de preparo de amostras que forneçam resultados mais reprodutíveis, exijam menores habilidades técnicas, que não utilizam ou utilizam microvolumes de solventes orgânicos, menor custo, menor tempo e forneçam extratos mais limpos (SILVEIRA, 2012). Neste contexto, novos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de reduzir a manipulação analítica, proporcionar significativa detectabilidade na recuperação de analitos, elevada repetibilidade, rapidez, baixo custo e facilidade de automatização.

A seguir é apresentada uma revisão bibliográfica referente às principais técnicas modernas de preparo de amostra referentes à microextração em fase líquida.

2.2 TÉCNICAS MODERNAS DE PREPARO DE AMOSTRA

As técnicas miniaturizadas de preparo de amostras tiveram grande impulso com o desenvolvimento da microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid phase microextraction*) proposta por Pawliszyn e colaboradores no ano de 1990. Em 1996 foram apresentados os primeiros trabalhos sobre a utilização da microextração em fase líquida (LPME, do inglês *liquid phase microextraction*) introduzidos por Liu e Dasgupta (1996), Jeannot e Cantwell (1996), e mais tarde por He e Lee (1997) e Jager e Andrews (1999).

A partir desses primeiros trabalhos realizados com microextração em fase líquida foram desenvolvidas diferentes variantes para a LPME, cada uma delas apresentando características específicas. Já a técnica de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME do inglês *dispersive liquid liquid microextraction*) foi só recentemente desenvolvida por Rezaee e colaboradores no ano de 2006 (REZAEI *et al.*, 2006).

2.2.1 Microextração em fase líquida (LPME)

A LPME, como abordado anteriormente, surgiu da necessidade de substituir e/ou modernizar as técnicas clássicas de preparo de amostra, neste caso a extração líquido-líquido. Apesar das vantagens claras do uso da LLE, essa técnica ainda é amplamente utilizada em laboratórios de análise de alimentos.

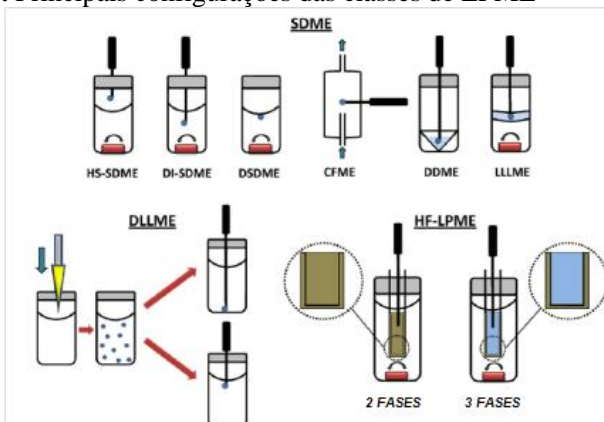
Em contrapartida, os diferentes modos de aplicação da LPME (microextração em gota única, microextração líquido-líquido dispersiva e de fibra oca) têm sido cada vez mais empregados para a extração de analitos inorgânicos e orgânicos em diferentes matrizes. Suas vantagens

sobre os procedimentos de extração convencionais são: a simplicidade, eficácia, rapidez e baixo consumo de solventes orgânicos, e, desta forma, tem atraído atenção de analistas de alimentos, pois a aplicação dessas técnicas tem apresentado bons resultados (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008; ASENSIO-RAMOS *et al.*, 2011; CARASEK; MERIB, 2015).

Geralmente, as técnicas de LPME combinam a extração, limpeza e concentração dos analitos em apenas um passo, e ocorre entre vários e poucos microlitros de um solvente imiscível com água (conhecido como extrator ou fase receptora) e uma fase aquosa (também conhecida em alguns casos, como fase doadora), que contém os analitos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008; GHAMBARIAN; YAMINI; ESRAFILI, 2012).

LPME possui diferentes modos de extração, sendo classificada em três categorias principais: microextração em gota única (SDME, do inglês *single-drop microextraction*) microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction*) e de fibra oca (HF-LPME do inglês *hollow fiber liquid phase microextraction*). Cabe ressaltar, que cada uma dessas classes possui diversas variações, as quais estão se perpetuando conjuntamente com as novas linhas de pesquisa desenvolvidas mundialmente. Desta forma, a LPME tem demonstrado sua versatilidade, além de outras vantagens como: a elevação dos fatores de enriquecimento dos analitos e a facilidade de introdução em sistemas cromatográficos ou eletroforéticos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008; PROSEN, 2014). A Figura 2 apresenta as principais variantes das três classes da LPME.

Figura 2. Principais configurações das classes de LPME



Fonte: Adaptado de Asensio-Ramos *et al.* (2011).

As técnicas de LPME são principalmente aplicadas para amostras líquidas, pois o procedimento pode ser empregado diretamente após operações simples como ajuste de pH, centrifugação, diluição, filtração, entre outros. Porém, a aplicação dessas técnicas para amostras de alimentos sólidos e semissólidos tem se tornado um desafio para os pesquisadores. Geralmente, para essas aplicações são necessários procedimentos anteriores, como extração sólido-líquido, limpeza por SPE, entre outros (ASENSIO-RAMOS *et al.*, 2011; HAN; ROW, 2012; VIÑAS *et al.*, 2014). Mesmo assim, o interesse pelo desenvolvimento e aplicação dessas técnicas em diferentes matrizes alimentares tem crescido exponencialmente.

2.2.2 Microextração em gota única (SDME)

A microextração em gota suspensa ou gota única (SDME) foi uma das primeiras técnicas de LPME desenvolvida, tendo sido criada em 1996 por Jeannot e Cantwell. Essa técnica baseia-se na extração dos analitos por meio de uma microgota de solvente orgânico imiscível em água. Neste tipo de extração, os analitos migram para fase extratora por difusão passiva, a agitação pode ser usada para aumentar a cinética de difusão, porém essa estratégia pode afetar a estabilidade da gota. Após a extração, a gota é recolhida para o interior da microseringa e pode ser injetada diretamente no sistema instrumental (HPLC ou GC). Inicialmente, a gota era acomodada na porção final de um dispositivo de politetrafluoretileno (PTFE), que era então imerso na solução contendo a amostra (JEANNOT; CANTWELL, 1996).

A extração dos analitos, geralmente é realizada em imersão direta da microgota (DI-SDME, do inglês *direct immersion*), porém outras configurações têm sido desenvolvidas, como por exemplo, a exposição da gota ao headspace da amostra (HS-SDME). O modo headspace assim como a microextração líquido-líquido-líquido (LLLME do inglês *liquid-liquid-liquid microextraction*) pode ser utilizado como um sistema de três fases, sendo que na LLLME, uma pequena quantidade de fase aquosa é colocada no interior da microseringa anterior a gota (JEANNOT; CANTWELL, 1996; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008). O uso de solvente orgânico menos denso que a amostra aquosa também pode ser empregado, o qual pode ser coletado na superfície da amostra após o tempo de extração. Outra alternativa, porém de difícil aplicação em microseringas, é a solidificação da microgota à temperatura mais baixa à sua, a qual é posteriormente recolhida com auxílio de uma espátula, a essa técnica nomeou-se de

microextração por gota orgânica flutuante solidificada (SFOD-ME, do inglês *solidified floating organic drop microextraction*) ou SFDME (do inglês, *solidification of floating drop microextraction*) (KHALILI ZANJANI *et al.*, 2007). E finalmente outra configuração recentemente desenvolvida é a utilização simultânea em modos HS e DI denominada (HS-DI-SDME, do inglês *direct immersion-headspace-single drop microextraction*) (MERIB *et al.*, 2015). Alguns modos da técnica de SDME são ilustrados na Figura 2 apresentada anteriormente.

Os principais solventes utilizados como fase extratora para a técnica de SDME são: tolueno, hexano, ciclo-hexano e xileno, embora os líquidos iônicos (LI) tenham sido igualmente utilizados proporcionando bons resultados. Esses solventes produzem condições de extração mais reprodutíveis, pois geram gotas maiores e mais estáveis durante o tempo de extração (ASENSIO-RAMOS *et al.*, 2011).

Dentre as principais vantagens da técnica de SDME, está a simplicidade de materiais e manuseio, além da quantidade ínfima de solvente orgânico utilizado. Entretanto, como mencionado anteriormente, a maior desvantagem encontrada no desenvolvimento da técnica é a baixa estabilidade da gota suspensa e por esse motivo certa resistência é encontrada para a implantação da técnica em laboratórios de análise. Outras desvantagens incluem a variação do volume da gota durante o processo de extração, especialmente quando se utiliza condições extremas de extração (velocidade de agitação elevada, longo tempo de extração, e alta temperatura), que afetam a estabilidade da gota e a precisão analítica, mas a quantificação pode ser proporcionada pela adição de um padrão interno. Essa técnica, geralmente, não é adequada para amostras com grande quantidade de material particulado, uma vez que as partículas suspensas podem levar a ruptura da gota (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008; PROSEN, 2014).

A técnica de SDME não possui muitas aplicações no campo de alimentos devido à complexidade das amostras. Para amostras de alimentos líquidos, a SDME tem sido usada para extrair espécies de diferentes naturezas como: leite, café, infusões de chá, cerveja, vinho, mosto e bebidas, sucos de frutas, óleo e molho de soja. Foram relatados estudos que utilizam SDME na análise de amostras de alimentos sólidos ou semissólidos, entre eles: farinha, leite em pó, sal, ervas e especiarias, frutas e legumes, peixes, aditivos alimentares, chocolate e mexilhões. Cabe ressaltar, que a análise de matrizes alimentares sólidas ou semissólidas por HS-SDME, como em qualquer modalidade LPME, requer uma extração anterior para a solubilização das substâncias a analisar (ASENSIO-RAMOS *et al.*, 2011).

A primeira aplicação de SDME para análise de amostra de alimento foi relatada em 2001 por Tankeviciute e colaboradores, os quais utilizaram HS-SDME combinada com a detecção por GC-ionização em chama (FID, do inglês *flame ionization detector*) para a determinação de oito alcoóis, em amostras de cerveja (TANKEVICIUTE; KAZLAUSKAS; VICKACKAITE, 2001). Atualmente, cerca de 40 estudos foram desenvolvidos e publicados, relatando a determinação de agrotóxicos por SDME e suas variações. Xiao *et al.* (2006) e Zhao *et al.* (2006) determinaram agrotóxicos organofosforados em sucos de frutas, Qian e He (2006) avaliaram agrotóxicos organoclorados e piretróides em chás (2006), Shrivas e Wu (2008) determinaram agrotóxicos organoclorados em peixe (XIAO *et al.*, 2006). Outros estudos que também se destacaram foram desenvolvidos por Amvrazi e colaboradores, os quais determinaram agrotóxicos em: tomate e abobrinha, (AMVRAZI; TSIROPOULOS, 2009a) uvas e maçãs (AMVRAZI; TSIROPOULOS, 2009b), tomate (AMVRAZI; PAPADI-PSYLLOU; TSIROPOULOS, 2010), mel (AMVRAZI; MARTINI; TSIROPOULOS, 2011; TSIROPOULOS; AMVRAZI, 2011), todos utilizando a técnica de SDME. Além disso, Garbi e colaboradores (2010) determinaram através da técnica de SDME agrotóxicos em vinhos, Dos Anjos e de Andrade (2015) em vinhos brancos e rose, e, finalmente, Dos Anjos e de Andrade (2014) avaliaram agrotóxicos organoclorados, organofosforados, piretróides, entre outros em amostras de água de coco pela técnica de SDME-GC/MS (GARBI *et al.*, 2010; DOS ANJOS; DE ANDRADE, 2014; 2015).

Para análise de micotoxinas em amostras alimentícias não foram encontrados trabalhos que relatam a aplicação de SDME como técnica de preparo de amostra. A seguir foi abordada a técnica de HF-LPME como ferramenta para preparo de amostras.

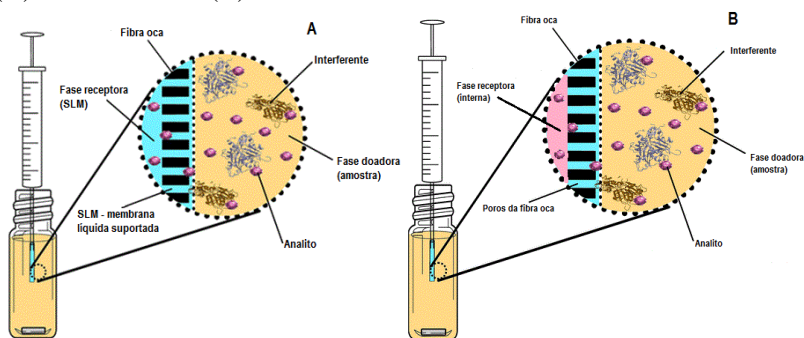
2.2.3 Microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME)

A técnica de HF-LPME surgiu como alternativa para evitar a instabilidade gota da técnica de SDME. Essa nova metodologia combina o conceito de extrações com membranas (SLM, do inglês *supported liquid membrane* e MMLLE do inglês *microporous membrane liquid-liquid extraction*) com o uso reduzido da razão solvente orgânico/fase aquosa, como visto na SDME. A microextração em fase líquida com fibra oca, HF-LPME do inglês *hollow fiber liquid-phase microextraction*, ou anteriormente denominada simplesmente de LPME, foi introduzida em 1999 por Pedersen-Bjergaard e Rasmussen. Os

analitos são primeiramente extraídos para uma membrana líquida suportada (SLM). Essa membrana é recoberta por um solvente orgânico de extração, o qual preenche também os poros da membrana capilar hidrofóbica (fibra oca), já o seu lúmen pode ser preenchido com microlitros de uma fase receptora aquosa (modo trifásico), ou pelo próprio solvente de extração (modo bifásico).

A **Figura 3** ilustra os dois modos de extração para HF-LPME, de acordo com o número de fases que constituem o sistema, ou seja, HF-LPME em modo bifásico (A) ou modo trifásico (B) (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008).

Figura 3. Esquema dos modos de extração utilizados em HF-LPME. (A) Modo bifásico (B) Modo trifásico



Fonte: Adaptado de Saraji e Boroujeni (2011)

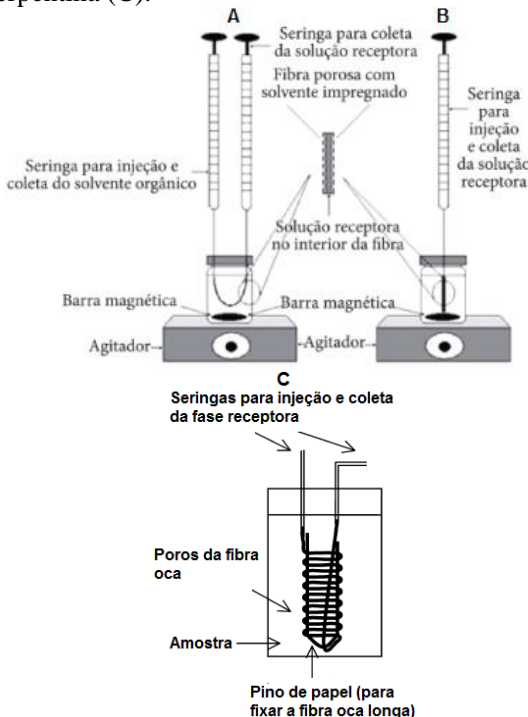
Em ambos os casos, o SLM é formada nos poros da parede da membrana quando a mesma é submersa por alguns segundos em um solvente orgânico (normalmente n-octanol, éter di-n-hexílico, tolueno, entre outros). No modo de duas fases, o mesmo solvente da SLM é introduzido no lúmen (fase receptora) e, então, a membrana é introduzida na amostra aquosa (fase doadora). Os analitos são, então, extraídos para a SLM e mais tarde para fase receptora, que pode ser introduzida diretamente num instrumento de GC. Já no modo trifásico, no lúmen da membrana é introduzida uma fase receptora aquosa ao invés do mesmo solvente orgânico da SLM, desta forma, a fase receptora aquosa pode então ser injetada diretamente em sistemas de HPLC ou CE. Em ambas as abordagens, tanto a fase doadora como a fase receptora são separadas pela membrana porosa de fibra oca, para que essas fases não entrem em contato direto, este fato permite a aplicação de agitação constante durante o procedimento (PEDERSEN-

BJERGAARD; RASMUSSEN, 1999; PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003).

A escolha do modo de HF-LPME a ser empregado depende majoritariamente das características dos analitos a serem analisados. O uso do sistema de duas fases é indicado para analitos com hidrofobicidade moderada a alta, enquanto o sistema de três fases tem uso preferencial para compostos ionizáveis ácidos ou básicos (HO; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2002; HO et al., 2003; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2004; RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004)

A disposição da membrana oca suportada pode variar em microsseringas ou em hastes de aço inoxidável. Na Figura 4, apresentada a seguir, podem ser observados os modos de disposição da membrana.

Figura 4. Diferentes configurações para HF-LPME, configuração em forma de U (A), configuração em forma de haste (“rod-like”) (B) e modo em serpentina (C).



Fonte: Adaptado de Oliveira *et al.* (2008 apud MERIB; CARASEK, 2013) e Halvorsen, Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (2001).

Inicialmente, a técnica de HF-LPME para análise de alimentos não era muito aplicada, porém a necessidade de novas técnicas para análise de matrizes complexas resultou em um incremento de pesquisas nesse campo. Cabe ressaltar, que conforme a necessidade de cada aplicação, novas configurações da técnica foram introduzidas.

Uma variante da técnica de HF-LPME tradicional é denominada de microextração em fibra oca com membrana líquida renovável (HFRLM, do inglês *hollow fiber renewal liquid membrane*), e foi introduzida por Zang e colaboradores em 2005. Essa variante baseia-se na adição de uma pequena quantidade de solvente extrator ou co-extrator na amostra. Devido à afinidade da fase orgânica pela membrana hidrofóbica, uma película fina de solvente orgânico é formada na interface entre a amostra e a membrana (ZHANG *et al.*, 2005). De acordo com Carletto *et al.* (2009), em consequência da agitação da amostra, ocorre a formação de microgotas orgânicas sobre a superfície da membrana líquida, as quais se separam a partir da superfície da membrana e provocam um aumento significativo da área de contato entre o solvente extrator e a amostra. Simultaneamente, as microgotas contidas na amostra são reintroduzidas no filme de solvente, renovando a membrana líquida, o que pode acelerar a velocidade de transferência de massa na camada limite hidrodinâmica, entre a interface da membrana com a fase doadora. Na fase doadora, uma fase orgânica adicional é necessária apenas para a renovação, renovando-se continuamente, e, evitando assim a degradação da membrana líquida (CARLETTO *et al.*, 2009). O método de HFRLM, já foi aplicado em amostras de alimentos para a análise de 5 sulfonamidas (antibióticos) em amostras de mel com separação/detecção por LC-MS/MS. As sulfonamidas são usualmente utilizadas na apicultura e podem causar resistência aos antibióticos em seres humanos. Neste trabalho, Bedendo, Jardim e Carasek (2010) desenvolveram uma técnica de HF-LPME de três fases modificadas, na qual a fase doadora foi composta por 0,625 g de mel, 10 g de sulfato de amônio e 10 mL de tampão acetato 0,05 mol/L em pH 5. Foram utilizados 8 cm de membrana oca de polipropileno e o lúmen da membrana foi preenchido com uma solução tampão de carbonato em pH 10 e à amostra foram adicionados 300 µL de uma mistura de 1-octanol:pentanol 55:45 (v/v). Após agitação, a fase receptora aquosa foi injetada no cromatógrafo a líquido (BEDENDO; JARDIM; CARASEK, 2010).

Nesse mesmo contexto, Bedendo e Carasek (2010) desenvolveram outra variação de microextração em fase líquida utilizando fibra oca. A técnica foi denominada como microextração

líquido-líquido (LLME, do inglês *liquid-liquid microextraction*) com extração em fase sólida com membrana microporosa de polipropileno (MMSPE, do inglês *microporous membrane solid phase extraction*). Essa metodologia foi utilizada para análise de agrotóxicos organoclorados em amostras de tomate e morango. Neste caso, ambas as matrizes foram homogeneizadas em um processador de alimentos e 1 g de amostra foi diluída em 15 mL de água deionizada. Após o ajuste de pH (pH 2 para morango e 4 para o tomate), a amostra foi submetida a agitação em ultrassom e centrifugação. Ao sobrenadante aquoso, que foi transferido para um frasco de vidro, foram adicionados 2,91 g de NaCl e 20 µL de 1-octanol. Uma haste de aço inoxidável contendo 1,5 cm de fibra oca de polipropileno fixada em sua extremidade foi introduzida à amostra. Desta forma, apenas a superfície externa e os poros das paredes estavam disponíveis para a extração dos analitos. O sistema foi mantido em 59 °C e agitado magneticamente por 60 min. Desta forma, 1-octanol (solvente extrator) contendo os analitos difundiram em direção à membrana sem solvente, onde permaneceram ligados por forças capilares. Em seguida, a dessorção líquida foi realizada colocando a fibra em 30 µL de tolueno:hexano (60:40, v/v) durante 10 minutos sem agitação. O procedimento proposto de LLME-MMSPE foi comparado com a técnica convencional MMLLE de duas fases ou HF-LPME, em que 1-octanol foi anteriormente impregnando nos poros da membrana e com o mesmo procedimento de dessorção. A primeira abordagem resultou em maior eficiência da extração, devido à introdução do 1-octanol diretamente na amostra, portanto, permitindo uma melhor interação entre o solvente de extração e os analitos (BEDENDO; CARASEK, 2010).

Outras evoluções do método de HF-LPME objetivaram combinar as vantagens de técnicas diferentes. No campo da análise de alimentos, Hu *et al.* (2009) desenvolveram uma fibra oca baseada em polímeros molecularmente impressos (MIP, do inglês *molecular imprinted polymer*). A essa técnica denominaram como (MIP)-microextração líquido-líquido-sólido (LLSME, do inglês *liquid-liquid-solid microextraction*), a qual possui como base a combinação de duas outras técnicas MIP-SPME e HF-LPME, para extrair um grupo triazinas em matrizes como melancia e leite. A melancia foi homogeneizada e triturada e seu suco foi submetido ao procedimento subsequente, enquanto que o leite foi filtrado através de um funil de Buchner. Para o desenvolvimento da LLSME, 6 µL de tolueno foram injetados no lúmen da fibra oca com comprimento de 2,5 cm, a qual, posteriormente, foi imersa em tolueno durante 20 s, com assistência de ultrassom para a

impregnação dos poros. O fundo da membrana foi selado com um alicate quente, e então a fibra foi colocada sobre a ponta do tubo de aço inoxidável para proteção e uma fibra de SPME de sílica revestida com MIP foi inserida no lúmen da membrana. A fase doadora foi formada por 3 mL de solução de amostra e a extração foi realizada por agitação durante 30 min a 1000 rpm. Em seguida, a desorção da fibra de SPME ocorreu em metanol com um dispositivo de acoplamento SPME-HPLC. A metodologia foi comparada com a técnica clássica de HF-LPME de duas fases (utilizando 1-octanol na SLM) e com um procedimento de MIP-SPME. Foi verificada uma detectabilidade aumentada usando LLSME em comparação com MIP-SPME (0,006-0,020 µg/L versus 0,18-0,30 µg/L, respectivamente). Para Hu *et al.* (2009), isso ocorreu devido ao duplo enriquecimento envolvido na técnica de MIP-LLSME. Além disso, os autores concordaram que a LLSME foi mais seletiva para os analitos alvo em comparação com a técnica clássica HF-LPME, em decorrência do uso de MIP (HU *et al.*, 2009).

Em 2006, Pedersen-Bjergaard e Rasmussen demonstraram, pela primeira vez, que um potencial elétrico produz extração analítica de fármacos básicos através de uma SLM, sendo este sistema de extração denominado por eletromembrana (EME). Neste estudo, os analitos foram extraídos de uma amostra aquosa através de um solvente orgânico (éter octil 2-nitrofenil, NPOE), imobilizado na parede de uma fibra oca de polipropileno porosa, como SLM. O lúmen da fibra oca foi preenchido com 30 µL de solução aquosa 10 mmol/L de HCl. Os compostos de interesse neste estudo foram petidina, nortriptilina, metadona, haloperidol, e loperamida. Essencialmente, a técnica é semelhante a uma HF-LPME, porém a migração através da SLM é forçada pelo campo elétrico gerado a partir de dois eletrodos colocados um fora da membrana e outro no interior, ou seja, no lúmen da mesma. A fim de assegurar uma mobilidade eletrocinética eficiente no sistema EME, o pH deve ser ajustado para proporcionar ionização total dos analitos nas duas soluções aquosas. A aplicação de tensão contínua sobre uma SLM permitiu extrações muito rápidas em amostras com pequenos volumes (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2006).

Após a abordagem de um panorama geral da técnica de HF-LPME e algumas evoluções desenvolvidas, a seguir serão apresentados os princípios e fundamentos da técnica.

2.2.3.1 Princípios e Fundamentos da técnica de HF-LPME

Como verificado anteriormente, a técnica de HF-LPME possui

dois modos de extração, um em duas fases e outro em três fases. No sistema de duas fases, os analitos são extraídos a partir da amostra aquosa, e migram para o solvente orgânico (solução receptora), presente na parede porosa e dentro do lúmen da fibra oca. Este processo pode ser ilustrado pela equação 1, a qual relaciona a concentração de analito (A) no equilíbrio entre a amostra (A_{amostra}) e a fase extratora orgânica receptora ($A_{\text{fase orgânica}}$)

$$A_{\text{amostra}} \rightleftharpoons A_{\text{fase orgânica}} \quad \text{Equação (1)}$$

O processo de migração dos analitos ocorre por difusão passiva, e a extração ocorre diretamente da fase doadora (amostra aquosa) para receptora (solvente orgânico) (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004). Desta forma, o coeficiente de partição do analito é definido como a partição do analito entre a solução orgânica receptora e a solução aquosa doadora ($K_{r/d}$), conforme a equação 2,

$$K_{r/d} = \frac{C_{\text{eq,r}}}{C_{\text{eq,d}}} \quad \text{Equação (2)}$$

onde, $C_{\text{eq,r}}$ corresponde à concentração do analito no equilíbrio na solução receptora e $C_{\text{eq,d}}$ é a concentração do analito no equilíbrio na solução doadora. Com base na Eq. (2) e um balanço de massa do sistema de duas fases, a recuperação (R) do analito A no estado de equilíbrio pode ser calculada pela seguinte equação (HO; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2002):

$$R(\%) = \frac{K_{r/d}V_{\text{org}}}{K_{r/d}V_{\text{org}} + V_{\text{d}}} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

onde, V_{org} é o volume total da fase orgânica no sistema (soma do solvente orgânico presente na parede porosa e no lúmen da fibra oca) e V_{d} é volume da amostra. A partir da Eq. (3) pode-se prever que a recuperação é dependente do coeficiente de partição, do volume de solvente orgânico, e do volume da amostra. Recuperações elevadas são obtidas para os compostos com coeficientes de partição elevados. Isto pode ser conseguido por seleção adequada do solvente orgânico, por seleção adequada do pH para analitos ácidos/básicos e, em alguns casos, por adição de cloreto de sódio em concentrações elevadas para a amostra. Além disso, pequenos volumes de amostra são benéficos para

obtenção de altas taxas de recuperação para extrações de equilíbrio.

Além disso, a cinética de extração de um sistema de 2 fases pode ser descrita conforme a equação 4,

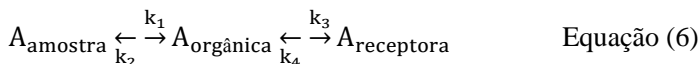
$$C_r = C_{eq,d}(1 - e^{-kt}) \quad \text{Equação (4)}$$

onde, k é a constante de velocidade (s-1) definida por

$$k = \frac{A_i}{V_{org}} \beta_0 \left(K_{r/d} \frac{V_{org}}{V_d} + 1 \right) \quad \text{Equação 5}$$

onde, C_r é a concentração do analito A na fase receptora (orgânica) no tempo t , A_i a área interfacial, e β_0 é o coeficiente de transferência de massa global para fase orgânica. A Eq. (5) revela que para extrações rápidas, A_i e β_0 devem ser maximizados e V_d deve ser minimizado. Além disso, o coeficiente de transferência de massa global pode ser maximizado por forte agitação do sistema de LPME em duas fases (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008).

Já no sistema utilizando três fases, o analito é extraído de uma solução aquosa (fase doadora) através de um solvente orgânico imobilizado nos poros de uma membrana oca (fase orgânica) para uma nova fase aquosa (fase receptora) presente no interior da fibra oca. A fase orgânica, nesse caso, funciona como uma barreira entre a solução receptora e a solução doadora, essa barreira não permite a mistura dessas duas fases aquosas. Nesse caso, a fase receptora é aquosa, sendo esse processo amplamente utilizado em sistemas de HPLC ou eletroforese capilar (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004). Essa metodologia de análise utilizando três fases foi originalmente denominada por Pederseen-Bjergaard e Rasmussen (1999) como LLLME (do inglês, *liquid-liquid-liquid microextraction*). A Equação 6 relaciona a concentração de analito no equilíbrio entre a amostra ($A_{amostra}$), a fase extratora orgânica ($A_{fase\ orgânica}$) e a fase aquosa receptora ($A_{fase\ receptora}$) para um sistema de HF-LPME com três fases.



onde, k_1 , k_2 , k_3 e k_4 são as constantes de velocidade de primeira ordem. Para estabelecer uma equação para cálculo da recuperação no equilíbrio, tanto o coeficiente de partição entre a fase orgânica (SLM) e

a amostra ($K_{org/d}$), equação 7, bem como o coeficiente de partição entre a fase receptora e a fase orgânica ($K_{r/org}$), equação 8, devem ser considerados:

$$K_{org/d} = \frac{C_{eq,org}}{C_{eq,d}} \quad \text{Equação (7)}$$

$$K_{r/org} = \frac{C_{eq,r}}{C_{eq,org}} \quad \text{Equação (8)}$$

onde $C_{eq,org}$ corresponde à concentração do analito no equilíbrio na fase orgânica, $C_{eq,d}$ é a concentração do analito no equilíbrio na solução doadora e $C_{eq,r}$ corresponde à concentração do analito no equilíbrio na solução receptora.

Desta forma, o coeficiente de partição entre a fase receptora e a fase doadora ($K_{r/d}$), que deve ser considerado como a força motriz global para a extração, é calculado como o produto de $K_{org/d}$ e $K_{r/org}$, representado pela Equação 9:

$$K_{r/d} = \frac{C_{eq,r}}{C_{eq,d}} = K_{org/d} \times K_{r/org} \quad \text{Equação (9)}$$

Com base nas equações (7) (8) e (9), e com base no balanço de massa total para o sistema de 3 fases, a seguinte equação pode ser apresentada para cálculo das recuperações (R), (HO; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2002):

$$R(\%) = \frac{K_{org/d} \times K_{r/org} \times V_r}{K_{org/d} \times K_{r/org} \times V_r + K_{org/d} \times V_{org} + V_d} \times 100 \quad \text{Equação (10)}$$

onde V_r é o volume da solução aquosa receptora V_d é o volume de solução aquosa doadora ou de amostra e V_{org} é o volume da fase orgânica imobilizada nos poros da fibra oca (SLM). A partir da Eq. (10), pode-se concluir que recuperações em sistemas de 3 fases são controlados pelos coeficientes de partição de $K_{org/d}$ e $K_{r/org}$, e pelos volumes da amostra, fase orgânica e fase receptora. Em geral, elevados coeficientes de partição são benéficos e podem ser obtidos pela seleção adequada do solvente orgânico (SLM) e seleção adequada das condições de pH nas soluções aquosas.

Para Ho, Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (2002), Rasmussen e

Pederseen-Bjergaard (2004) e Pederseen-Bjergaard e Rasmussen (2008), dois aspectos práticos podem ser compilados a partir dos fundamentos da técnica de HF-LPME: (1) o procedimento fornece taxas de enriquecimento muito elevadas e (2) as extrações são sensíveis à magnitude dos coeficientes de partição. Além disso, os autores enfatizam que a técnica apresenta excelentes resultados para substâncias de baixa polaridade, inclusive melhores taxas de enriquecimento se comparadas com a técnica tradicional de LLE, porém para substâncias polares a técnica pode ser ineficiente e isto pode justificar o efeito de limpeza que a técnica possui. O efeito de limpeza atribuído à técnica se deve a remoção de substâncias interferentes mais polares como aminoácidos e proteínas, tanto pela similaridade dessas moléculas com a fase doadora (aquosa) como por exclusão de tamanho por causa dos poros da membrana, a qual não permite que moléculas grandes como proteínas, lipídeos e fibras passem para fase receptora.

2.2.3.2 Parâmetros que afetam e devem ser otimizados na extração em HF-LPME

Além das características inerentes do analito (coeficientes de ionização e partição) alguns outros parâmetros devem ser considerados durante o desenvolvimento do método, tais como ajuste do pH da amostra, força iônica, membrana hidrofóbica, tipo de solvente orgânico, tempo e temperatura de extração, composição da solução receptora, agitação do sistema e razão das fases receptora e doadora.

2.2.3.2.1 Escolha da membrana

As membranas capilares empregadas em LPME devem possuir certa hidrofobicidade para que o uso de solvente orgânicos na SLM seja compatível, também devem conter alta porosidade para que os solventes orgânicos fiquem imobilizados nas paredes da membrana, separando a fase doadora e receptora (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). As membranas mais utilizadas são as de polipropileno, disponíveis comercialmente pela empresa Membrana (Wuppertal, Alemanha), a qual disponibiliza membranas capilares e planas que podem ser utilizadas para aplicação da técnica. O modelo de membrana capilar mais utilizado é a Acurrel PP Q3/2 tamanho de poro de 0,2 μm , espessura de parede de aproximadamente 200 μm e diâmetro interno de 600 μm . Essas membranas apresentam características muito favoráveis à aplicação da técnica uma vez que permitem a microfiltração de macromoléculas

interferentes, como é o caso de proteínas (ANDERSEN *et al.*, 2002).

2.2.3.2.2 Solvente orgânico

Na otimização de um procedimento de HF-LPME, a escolha do solvente orgânico é considerada etapa fundamental. O solvente selecionado deve possuir algumas características tais como: ter boa seletividade e alta eficiência de extração para os analitos de interesse, baixa solubilidade ou insolubilidade em água, prevenindo a dissolução da fase orgânica na aquosa (doadora); baixa volatilidade, evitando a perda de fase orgânica durante a extração; compatibilidade com a membrana capilar utilizada, fácil impregnação nos poros da mesma e apresentar alta pureza, ou seja, ser livre de contaminantes ou interferentes que possam prejudicar a análise (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2004).

2.2.3.2.3 Tempo de extração

Assim como na maioria das técnicas de extração líquida, a transferência de massa do analito de uma matriz ou fase doadora para a fase receptora é fator fundamental para a eficiência da extração. Desta forma, na HF-LPME, a transferência de massa depende do tempo para que o equilíbrio entre a fase aquosa/orgânica (sistema bifásico) ou aquosa/orgânica/aquosa (sistema trifásico) seja alcançado. Portanto, nessa técnica a recuperação do analito aumenta com o tempo de extração até atingir uma situação de platô (equilíbrio) na qual a distribuição do analito entre as fases permanece constante (BASHEER; BALASUBRAMANIAN; LEE, 2003; RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004). Halvorsen, Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (2001) utilizaram o aumento da área superficial em contato com a fibra oca para a diminuição do tempo de extração, o modo desenvolvido pode ser observado na Figura 3 (HALVORSEN; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2001). Cabe ressaltar, que em muitos casos, o tempo necessário para que o equilíbrio seja atingido é longo; portanto, a extração é feita em condições de não equilíbrio, controlando-se precisamente o tempo de extração (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

2.2.3.2.4 Ajuste do pH

Outro parâmetro que pode afetar a eficiência de extração na técnica de HF-LPME, é o ajuste do pH, tanto da solução doadora (amostra) como da receptora no caso de extração em modo trifásico. Para Pedersen-Bjergaard e Rasmussen, (2000), o pH da amostra afeta o equilíbrio de dissociação e a solubilidade de analitos com características ácidas ou básicas, logo uma maior razão de distribuição entre as fases, resulta em maiores valores de recuperação dos analitos (HO; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2002).

Para isso, o pH deve ser ajustado em um valor de pelo menos 1,5 unidade menor em relação ao pKa para as espécies ácidas e, em caso contrário, em pelo menos 1,5 unidade acima do pKa para qualquer soluto básico. Geralmente, para analitos ácidos, o pH da amostra é ajustado entre 0,1 e 3,5, enquanto que para analitos básicos o ajuste varia entre 10 e 14. Num sistema de HF-LPME utilizando três fases, o pH da solução receptora deve ser ajustado a valores que garantam a ionização (protonação) dos analitos, dessa forma, soluções receptoras básicas devem ser usadas para analitos ácidos e soluções receptoras ácidas devem ser utilizadas para analitos básicos. Esse ajuste do pH da fase receptora permite assegurar a extração dos analitos para a fase receptora e prevenir o seu retorno para a fase orgânica localizada nos poros da membrana (ESRAFILI; YAMINI; SHARIATI, 2007).

De acordo com Merib e Carasek (2013), o pH é um parâmetro muito importante que afeta a eficiência de extração quando se trabalha com um sistema de HF-LPME utilizando três fases. O pH da fase doadora deve ser ajustado para manter os analitos na forma não ionizada, enquanto que o pH para a fase receptora deve ser ajustado a um valor em que os analitos permaneçam na forma ionizada. A diferença de pH entre a fase doadora e a receptora 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 receptora. Além disso, para assegurar altas recuperações, os volumes de amostra e fase orgânica devem ser tão pequenos quanto possível para maior concentração dos analitos (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008).

De acordo com Pedersen-Bjergaard, Ho e Rasmussen (2002), nas aplicações de HF-LPME trifásica para análise de fármacos de caráter básico, os principais ácidos utilizados nas soluções são: ácido acético, fórmico, sulfúrico, clorídrico, nítrico e trifluoracético. Já para extração de analitos ácidos, soluções de hidróxido de sódio $0,01-0,1 \text{ mol L}^{-1}$ são

comumente empregadas como fases receptoras (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2000).

2.2.3.2.5 Agitação da amostra

A agitação da amostra é utilizada para acelerar a cinética de extração dos analitos, desta forma, aumentando a taxa de agitação da solução doadora acelera-se a extração, bem como a difusão dos analitos através da interface fase doadora/solvente orgânico. No caso da HF-LPME, como o solvente orgânico da SLM e a fase receptora estão protegidos pela membrana cilíndrica, o uso de velocidades de agitação mais elevadas não compromete a eficiência de extração do método. De acordo com Kokosa, Przyjazny e Jeannot (2009), taxas de agitação próximas de 2000 rpm podem ser usadas para sistemas de duas fases e 1500 rpm em sistemas de três fases. As formas de agitação mais recomendadas são a agitação com barra magnética e o banho de ultrassom, embora, alguns autores afirmem que a agitação com barra magnética possa causar contaminação cruzada das amostras e formação de bolhas de ar que tendem aderir na fibra, introduzindo assim imprecisão nas medições (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2000; SHEN; LEE, 2002).

2.2.3.2.6 Razão dos volumes de solução da fase doadora e fase receptora

De acordo com Rasmussen e Pedersen-Bjergaard (2004), a técnica de HF-LPME tanto em duas ou três fases possui como grande diferencial, altos fatores de enriquecimento, e desta forma, um aumento na detectabilidade do método. Isso se deve ao fato da utilização de pequenos volumes de fase receptora, ou seja, poucos μL . Logo, quanto menor a razão entre o volume de fase receptora/doadora, maior será o fator de enriquecimento da técnica.

2.2.3.2.7 Aditivos na fase doadora

A adição de algumas substâncias na amostra pode aumentar a eficiência de extração dos analitos. Desta forma, a seguir alguns exemplos de aditivos serão abordados.

- a) *Adição de sais ou ajuste da força iônica:* Dependendo dos analitos, a adição de sal e a consequente mudança da força iônica da solução da amostra podem afetar significativamente

os resultados obtidos com a microextração em fase líquida, porém esse efeito sobre a matriz é complexo. Para Psillakis e Kalogerakis (2003), a adição de sal para extração de analitos mais polares pode diminuir a solubilidade dos analitos na fase aquosa e, dessa forma, aumentar a eficiência de extração em virtude do efeito *salting-out*. Neste processo, as moléculas de água da fase doadora (amostra) passam a hidratar também os íons adicionados ocorrendo, então, a redução de moléculas do analito dissolvidos na solução aquosa por mecanismos de competição (ULRICH, 2000). Em contrapartida, a adição de sais pode ter um efeito negativo na eficiência de extração dos analitos menos polares, pelo aumento da viscosidade da amostra e consequente redução na mobilidade dos analitos, e também pela redução da difusão dos mesmos para a fase extratora (SHEN; LEE, 2002; UGLAND; KROGH; REUBSAET, 2003).

- b) *Modificadores orgânicos*: Além da adição de sais, alguns modificadores podem afetar a eficiência de extração em HF-LPME. A adição de solventes orgânicos, como metanol e etanol, aumenta a eficiência da técnica de HF-LPME quando analisados fármacos em fluídos biológicos. Isso se deve ao fato do solvente suprimir as interações hidrofóbicas existentes entre o fármaco e proteínas plasmáticas, permitindo que o analito fique livre para extração e, consequentemente, aumentando a eficiência do método, pela diminuição do efeito matriz. Além disso, a adição desses solventes provoca a precipitação das proteínas, aumentando a transferência de massa pela diminuição da viscosidade da amostra. Porém, a otimização da quantidade e tipo de solvente adicionado é crucial, pois o mesmo pode afetar a distribuição do analito de forma a gerar uma competição entre o modificador e o solvente orgânico extrator contido na fibra oca e, consequentemente, gerar prejuízo para extração (HO; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2002; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2004).

2.2.3.3 Aplicações da técnica de HF-LPME para análise de agrotóxicos e micotoxinas em alimentos

A aplicação do método de HF-LPME como ferramenta para o preparo de amostra na análise de matrizes alimentícias ainda está em

evolução na literatura científica. Poucos estudos abordam a análise de agrotóxicos (7 pesquisas) e apenas dois artigos estão relacionados com extração de micotoxinas em alimentos quando detectados por cromatografia líquida. Esta revisão foi concentrada nesses tipos de analitos, pois os mesmos foram utilizados para aplicação da técnica desenvolvida no presente trabalho.

O crescente interesse pelo uso da técnica HF-LPME para análise de agrotóxicos e micotoxinas em alimentos se deve pelas vantagens que esse método apresenta, principalmente, no que se refere à retirada de interferentes de matrizes complexas, como é o caso de amostras de alimentos. De acordo com Lee *et al.* (2008), Asensio-Ramos *et al.* (2011) e Carasek e Merib (2015), a principal aplicação da técnica de HF-LPME refere-se à extração de agrotóxicos a partir de diferentes matrizes, como leite, vinho, cerveja, chá, frutas ou legumes. Quanto aos métodos de separação/detecção, a cromatografia gasosa ainda é o método prevalecente para análise desse tipo de compostos, principalmente em se tratando da análise de agrotóxicos. Quanto as configurações da extração por HF-LPME, tanto os modos de 2 e 3 fases são utilizados, com prevalência do método de 3 fases. Em relação aos solventes utilizados como revestimento para SLM, ou como fase extratora, o 1-octanol é considerado a substância com maior potencial extrator (LEE *et al.*, 2008; ASENSIO-RAMOS *et al.*, 2011; CARASEK; MERIB, 2015).

Embora outros analitos, orgânicos e inorgânicos, também sejam extraídos de diversas matrizes alimentares na Tabela 1, os principais estudos relacionados com a análise de agrotóxicos e micotoxinas por HF-LPME e detecção por cromatografia líquida são apresentados.

Tabela 1. Resumo dos trabalhos encontrados referentes ao uso da técnica de HF-LPME para análise de agrotóxicos e micotoxinas em alimentos detectados por cromatografia líquida

(Continua)

Analitos	Matriz	Pré tratamento da amostra	Modo e SLM	Fase		Extração	Método de separação/deteccção	Recuperação (RSD)	Faixa linear (LOD)	Referência
				Doadora	Receptora					
Agrotóxicos										
5 Herbicidas fenoxiácidos	Leite bovino	Desproteínação e centrifugação	3 HF-LPME 1-octanol	8 mL extrato aquoso, 0,5 mol/L HCl	0,1 mol/L NaOH (7 µL)	HF-PP Q3/2 Accurel 3,5 cm agitação 1200 rpm, 60 min	HPLC- UV	71–89% (<7%)	0,5 ng/mL	(ZHU <i>et al.</i> , 2002)
51 agrotóxicos multiclassas	Vinho e cerveja		2 HF-LPME 1-octanol	15 mL amostra	1-Octanol	HF-PP Q3/2 Accurel 2 cm Sorção: agitação 90 rpm, 45 min) Dessorção: Agitação, 30 rpm, 5 min em 1,5 mL de MeOH	UHPLC-MS/MS	73–112% (<16%)	0,01–5,61 µg/L	(BOLAÑOS <i>et al.</i> , 2008)
23 agrotóxicos multiclassas	Pepino, tomate e pimenta	Diluição em 5 mL de tampão em pH 4 contendo NaCl	3 HF-LPME 1% óxido trioctilfosfina dissolvido em éter diexílico MIP-LLSME 1-octanol	Extrato aquoso, pH 4,	HCl 0,1 mol/L com 20% MeOH (15 µL)	HF-PP 50/280 Accurel 25 cm Agitação 40 osc./min, 1 h	HPLC-MS		0,06–2,7 µg/kg	(ROMERO-GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2006)
6 Atrazinas	Melancia e Leite	Homogeneização (melancia) e Filtração (leite)	Comparação com HF-LPME MIP-SPME	3 mL de amostra	1-Octanol (6 µL)	HF-PP Q3/2 Accurel 2,5 cm Sorção: Agitação 1000 rpm, 30 min. Dessorção: em MeOH	HPLC-UV	71-103% (1,2–9,6%)	0,08–0,2 µg/L	(HU <i>et al.</i> , 2009)
2 Fungicidas	Suco de laranja	Filtração e Centrifugação	3 HF-LPME 2-octanona	3 mL de amostra com 120 mmol/L NaOH	10 mmol/L HCl (20 µL)	HF-PP Q3/2 Accurel 2,2 cm Sorção: agitação 1000 rpm, 30 min	CE-DAD e HPLC-MS	17–34% (<11%)	0,05–0,10 µg/L	(BARAHONA <i>et al.</i> , 2010)

										(conclusão)
Carbendazina e Tiabendazol	Suco de maçã		3 HF-LPME 1-octanol	Amostra com pH de 7,5	5 m mol/L HCl pH = 2,5	Sorção: agitação 800 rpm por 40 min.	HPLC-FD	86,3-106% (< 8,5%)	0,8-1,5 µg L ⁻¹	(LIU <i>et al.</i> , 2011)
7 agrotóxicos	Pepino	Trituração, Homogeneização, Ultrassom (5 min.) Centrifugação	3 HF-LPME clorofórmio	5 mL da amostra aquosa	Clorofórmio (32 µL)	HF- PVDF – 8 cm Sorção: agitação 300 rpm por 20 min; Dessorção por 1 min MeOH:água (1:1)	UHPLC–MS/MS (MRM)	63-119% (<20%)	0,01-0,31 µg/kg	(WANG <i>et al.</i> , 2012a)
Micotoxinas										
Ocratoxina A	Vinho	Diluição com tampão fosfato Limpeza com IAC	2 HF-LPME 1-octanol	4 mL de amostra pH 1,05 (HCl)	1-Octanol (15µL)	HF-PP Q3/2 Accurel 4 cm Sorção: agitação 1000 rpm, 45 min. Dessorção: sonicação com MeOH	HPLC-FD	77% (<8%)	0,2 ng/mL	(GONZÁLEZ-PEÑAS <i>et al.</i> , 2004)
Ocratoxina A e toxina T-2	Vinho e Cerveja	Diluição com HCl 0,01 mol/L Desgaseificação (cerveja)	2 HF-LPME 1-octanol	12 mL de amostra	3 mL 0,01 M HCl, 10% NaCl	HF-PP Q3/2 Accurel 2 cm Sorção: agitação rotatória 90 rpm, 4 h; Dessorção: 1,5 mL MeCN:água (80:20) pH 7	UHPLC–MS/MS	79–105% (<12%)	0,02–0,09 µg/L	(ROMERO-GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2010)

2 HF-LPME Microextração em Fase Líquida com Fibra Oca em duas fases; 3 HF-LPME Microextração em Fase Líquida com Fibra Oca em três fases; CE-DAD – Eletroforese Capilar com detecção por Arranjo de Diodos; HF-PP – Fibra Oca de polipropileno; HPLC-FD Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Fluorescência; rpm – rotações por minuto; HPLC-UV Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Ultravioleta; IAC – Coluna de Imunoafinidade; LOD - Limite de detecção; LPME – Microextração em fase líquida; MIP-LLSME – Microextração Líquido-Líquido-Sólido com Polímero Molecularmente Impresso; MIP-SPME – Microextração em Fase Sólida com Polímero Molecularmente Impresso; R(%) - Recuperação; RSD(%) - Desvio Padrão Relativo; SPE - Extração em Fase Sólida; UHPLC -MS/MS – Cromatografia Líquida de Ultra Alta Performance com detecção por Espectrometria de Massas Sequencial.

De acordo com os estudos encontrados, o octanol é o solvente mais utilizado como SLM ou recobrimento da fibra oca (ZHU *et al.*, 2002; BOLAÑOS *et al.*, 2008; HU *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2011; (GONZÁLEZ-PEÑAS *et al.*, 2004); ROMERO-GONZÁLEZ *et al.*, 2010). Porém, outros solventes também têm sido utilizados, entre eles éter diexílico (ROMERO-GONZÁLEZ *et al.*, 2006), 2-octanona (BARAHONA *et al.*, 2010) e clorofórmio (WANG *et al.*, 2012a).

Quanto aos modos existentes de HF-LPME, o modo em duas fases é também denominado como extração líquido-líquido com membrana microporosa (MMLLE, do inglês *microporous membrane liquid-liquid extraction*). Neste modo, o solvente orgânico utilizado na SLM serve como extrator dos analitos contidos na amostra aquosa. A seguir a fibra oca é retirada da fase doadora e colocada em frasco apropriado para dessorção. Esta abordagem de HF-LPME tem sido aplicada para análise de alimentos, particularmente para a determinação de ocratoxina A (GONZÁLEZ-PEÑAS *et al.*, 2004; ROMERO-GONZÁLEZ *et al.*, 2010), toxina T-2 (ROMERO-GONZÁLEZ *et al.*, 2010), e agrotóxicos (BOLAÑOS *et al.*, 2008) em bebidas alcoólicas.

Bolaños e colaboradores (2008) utilizaram a técnica de HF-LPME em duas fases para determinar 51 agrotóxicos em vinho e cerveja. Nesse estudo, os pesquisadores utilizaram 2 cm de fibra oca de PP, recobertas com 1-octanol. A extração foi realizada utilizando 15 mL de amostra, na qual a fibra ficou totalmente submersa durante 45 min sob agitação de 90 rpm. Em seguida, a fibra foi removida do êmbolo da seringa de 10 µL na qual estava fixada e foi procedida a dessorção dos analitos em frasco contendo 1,5 mL de MeOH sob agitação de 30 rpm por 5 min. Finalmente, o extrato foi analisado através de UHPLC-MS/MS. As recuperações obtidas variaram entre 73-112%, e os LOD variaram entre concentrações de 0,01-2,00 µg L⁻¹. Os autores também verificaram neste estudo que o procedimento desenvolvido melhorou a detectabilidade dos analitos, quando comparado com a injeção direta da amostra fortificada.

Além da técnica de HF-LPME, outras técnicas de microextração em fase líquida têm sido utilizadas para análise de micotoxinas e agrotóxicos em alimentos, dentre elas a técnica de DLLME, assunto abordado a seguir.

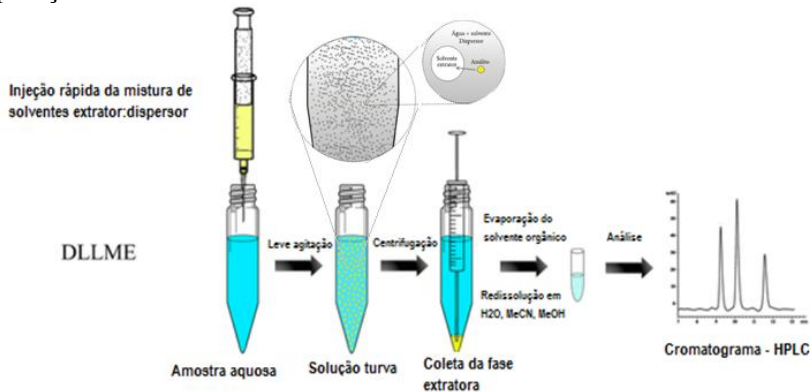
2.2.4 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

A microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) foi descrita por Rezaee *et al.* (2006) e Berijani *et al.* (2006) como uma nova técnica

de microextração baseada em estudos anteriores de LPME, sendo considerada a mais recente das variações de LPME (BERIJANI *et al.*, 2006; REZAEI *et al.*, 2006). Essa técnica é muito similar à chamada extração em ponto de nuvem (RIDGWAY; LALLJIE; SMITH, 2007).

No modo convencional da técnica, uma mistura de solventes orgânicos extrator:dispersor é rapidamente injetada em uma amostra aquosa com auxílio de uma microsseringa, formando assim um sistema ternário de uma fase aquosa contendo os analitos, um solvente de extração imiscível com a água e um solvente dispersor miscível em água. A turbulência produzida por essa injeção provoca a formação microgotas que ficam dispersas na amostra aquosa. Essas gotículas emulsionadas possuem uma grande área superficial, e desta forma, o equilíbrio é alcançado rapidamente, ou seja, a extração é quase instantânea, e, além disso, o alto fator de enriquecimento do analito são os principais diferenciais da técnica (BAN *et al.*, 2000). A Figura 5 apresenta um esquema da técnica.

Figura 5. Diagrama simplificado demonstrando a injeção da mistura dos solventes na amostra, a dispersão do solvente extrator na amostra e a partição do analito entre a amostra e o solvente extrator.



Fonte: Adaptado de Saraji, Ali e Bidgoli (2011) e Martins *et al.* (2012).

Após a extração propriamente dita, a mistura turva é centrifugada e as microgotas da fase de extratora são sedimentadas no fundo de um tubo cônico (PENA-PEREIRA; LAVILLA; BENDICHO, 2009). A fase extratora sedimentada então pode ser injetada diretamente no equipamento cromatográfico ou eletroforético (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010), ou em caso de incompatibilidade com o sistema instrumental, pode-se evaporar o solvente em atmosfera inerte de N₂ e

redissolver em outro solvente mais compatível com o sistema (ASENSIO-RAMOS *et al.*, 2011; VIÑAS *et al.*, 2014). Após a descrição referente ao procedimento da técnica de DLLME, a seguir são apresentados os princípios e teoria da mesma.

2.2.4.1 Princípios e Fundamentos da técnica de DLLME

Como mencionado anteriormente, a técnica de DLLME, assim como a tradicional extração líquido-líquido, se baseia na partição dos analitos entre duas fases líquidas imiscíveis, sendo uma delas a fase aquosa (a amostra) e a outra uma fase orgânica (solvente orgânico). A diferença entre a maior polaridade da fase aquosa e a menor polaridade da fase orgânica determina a distribuição do analito entre as fases. De acordo com Harris (2012 *apud* MARTINS *et al.*, 2012), a polaridade de uma molécula refere-se às concentrações de cargas da nuvem eletrônica em volta da molécula. Moléculas polares possuem maior concentração de carga negativa numa parte da nuvem e maior concentração positiva em outro extremo. Nas moléculas apolares, a carga eletrônica está uniformemente distribuída. As diferenças de cargas elétricas entre as moléculas dos analitos, da fase aquosa (amostra polar) e da fase orgânica (apolar), é que determinam o equilíbrio resultante, que pode ser representado pela equação 11.

$$A_{\text{fase aquosa}} \rightleftharpoons A_{\text{fase orgânica}} \quad \text{Equação (11)}$$

O coeficiente de partição de um analito em duas fases imiscíveis pode ser expresso como na equação 12, apresentada a seguir:

$$K_{\text{org/aq}} = \frac{C_{\text{org}}}{C_{\text{aq}}} \quad \text{Equação (12)}$$

onde: $K_{\text{org/aq}}$ coeficiente de distribuição ou partição do analito, C_{org} é concentração do analito na fase orgânica e C_{aq} é concentração do analito na fase aquosa.

De acordo com Rezaee *et al.* (2006), o equilíbrio da técnica de DLLME é atingido rapidamente e a separação das fases então ocorre. De acordo com os autores, a fase orgânica pode conter a maior proporção do analito. Se esta quantidade for próxima a 100% pode ser considerada uma técnica de extração exaustiva e a exatidão do método, expressa em termos de recuperação, pode ser calculada de acordo com a Equação 13:

$$R(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad \text{Equação (13)}$$

onde, C_1 = concentração do analito determinada na amostra fortificada; C_2 = concentração do analito na amostra não fortificada; C_3 = concentração do analito adicionada na amostra fortificada.

Porém, se a transferência do analito entre as fases for parcial, a técnica de extração é considerada não exaustiva, e a quantificação do analito deve ser realizada em condições de pré-equilíbrio, e a recuperação (R) de acordo com Ho, Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (2002), deve ser calculada conforme a Equação 14, a qual é regida igualmente a técnica de HF-LPME em duas fases:

$$R(\%) = \frac{K_{\text{org/aq}} V_{\text{org}}}{K_{\text{org/aq}} V_{\text{org}} + V_{\text{aq}}} \times 100 \quad \text{Equação (14)}$$

onde, $K_{\text{org/aq}}$ é o coeficiente de partição do analito entre as fases; V_{org} = volume da fase orgânica; V_{aq} = volume da fase aquosa (ou doadora).

Conforme abordado na técnica anterior de HF-LPME em duas fases, a recuperação pode ser definida como a quantidade total de analito, em porcentagem, que é transferida para a fase orgânica (receptora). A razão entre o volume da fase doadora (aquosa) e da fase receptora (orgânica) influencia consideravelmente a recuperação do analito e, portanto, a extração de analitos com coeficientes de partição elevados (compostos hidrofóbicos) e o aumento da razão entre os volumes de fase aquosa e fase orgânica são parâmetros que favorecem a recuperação e a taxa de enriquecimento da técnica (RASMUSSEN; PEDERSEEN-BJERGAARD, 2004; PEDERSEEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008).

De acordo com Rezaee *et al.* (2006) e Martins *et al.* (2012), outros fatores que afetam a polaridade relativa do sistema, tais como presença ou adição de sais, alterações no pH da fase aquosa, modificadores químicos ou misturas de solventes solúveis ou parcialmente solúveis na fase aquosa interferem na eficiência de extração do método, e alguns desses fatores serão abordados na seção a seguir.

2.2.4.2 Parâmetros que afetam e devem ser otimizados na extração por DLLME

2.2.4.2.1 Seleção do solvente de extração

Vários parâmetros têm grande influência sobre a eficiência da extração em DLLME e devem ser considerados na etapa de otimização do método. A seleção do solvente de extração utilizado é um dos mais importantes fatores que influenciam a eficiência da extração. Na técnica de DLLME convencional, os solventes orgânicos são selecionados de acordo com as seguintes características: densidade mais elevada que a da água, capacidade de extrair os analitos, capacidade para formar uma solução turva estável, baixa solubilidade em água, e bom comportamento cromatográfico ou eletroforético. Cabe ressaltar, que sistemas instrumentais de LC requerem solventes orgânicos compatíveis, contudo se observa que em vários estudos, solventes como hidrocarbonetos halogenados e não halogenados, além de misturas como clorofórmio:diclorometano, dibromometano:tetracloreto de carbono, clorobenzeno:clorofórmio são utilizados como extratores; e esses são incompatíveis com a cromatografia líquida em fase reversa devido à sua elevada densidade e natureza hidrofóbica. Portanto, é necessário incluir um passo adicional para evaporação desses solventes anterior à análise cromatográfica (HERRERA-HERRERA *et al.*, 2010; ASENSIO-RAMOS *et al.*, 2011).

2.2.4.2.2 Volume de solvente extrator e dispersor ou razão entre os volumes

O volume do solvente de extração tem um importante efeito sobre o fator de concentração. Quando o volume do solvente é aumentado, o volume de fase sedimentada obtida pela centrifugação aumenta e ocorre a diminuição do fator de concentração, ou seja, enriquecimento dos analitos. Assim, o volume ideal deve garantir um elevado fator de pré-concentração e um volume suficiente para análise posterior, após a centrifugação (VIÑAS *et al.*, 2014). A maioria dos volumes extratores variam entre 15-300 μL , e apenas alguns estudos têm utilizado volumes maiores ou até 2 mL. Na seleção do solvente dispersor, a miscibilidade tanto com o solvente de extração quanto com a fase aquosa é um elemento essencial. Acetonitrila, metanol, acetona, 2-propanol, 1 propanol, tetraidrofurano e etanol são solventes dispersores comumente utilizados (HERRERA-HERRERA *et al.*, 2010). O volume do solvente

dispersor também afeta diretamente a formação da solução turva (água/solvente dispersor/solvente extrator), o grau de dispersão do solvente extrator na fase aquosa, e, por conseguinte, a eficiência da extração. Variações no volume do solvente dispersor altera o volume da fase sedimentada. Assim, é necessário alterar os volumes dos solventes dispersor e extrator simultaneamente, para obter um volume constante da fase sedimentada. Os volumes de solvente dispersor geralmente usados variam entre 0,2 e 3 mL. No entanto, volumes inferiores como 50 μ L, também têm sido utilizados. Além disso, o volume da amostra, ou seja, da fase aquosa, também afeta a eficiência da técnica (BIPARVA; EHSANI; HADJMOHAMMADI, 2012; LEONG; FUH; HUANG, 2014).

Outros parâmetros como tempo de extração, agitação, adição de sais e ajuste de pH, também influenciam na eficiência da técnica de DLLME, porém eles são comuns para outras técnicas de microextração e foram abordados separadamente na seção anterior.

2.2.4.3 Alternativas que podem auxiliar na eficiência da técnica de DLLME

Solventes de baixa densidade como, por exemplo, alcoóis de cadeia longa como 1-undecanol, 1-octanol, n-hexanol, 1-dodecanol, entre outros, também têm sido explorados como extratores, porém, neste caso, uma gota flutuante é coletada após a centrifugação (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010; LEONG; FUH; HUANG, 2014). O uso deste tipo de solvente pode ser benéfico dependendo das características do alimento, sendo que no caso de sedimentação facilitada, pode ser uma vantagem. Este é o caso do estudo de Moinfar e Hosseini (2009), que determinaram um grupo de dez agrotóxicos organofosforados em amostras de chá. A extração foi realizada por adição de 2 mL de uma mistura de acetonitrila e n-hexano (250:3, v/v) diretamente a 1,0 g de pó de chá verde. A utilização da mistura de acetonitrila/n-hexano permitiu a coleta do extrato sem realizar uma filtração anterior, pois após centrifugação as partículas de chá foram sedimentadas. Em seguida, 0,5 mL do sobrenadante, contendo tanto solvente extrator (n-hexano) e dispersor (acetonitrila) foram rapidamente introduzidos em 5 mL de água deionizada e, neste momento, houve a formação da solução turva de dispersão. O tubo cônico foi então invertido e centrifugado e a gota de n-hexano contendo os analitos foi coletada por microsseringa de 1,00 μ L. Posteriormente o extrato foi injetado em sistema de GC-FPD (do inglês, *gas chromatography with flame photometric detector*)

(MOINFAR; HOSSEINI, 2009).

No que diz respeito também à utilização de solventes com densidade inferior à da água, se a solução é resfriada e o solvente com baixo ponto de fusão sofre solidificação, tem-se a técnica denominada de solidificação de gota orgânica flutuante (SFO do inglês *solidification floating organic droplet*), a qual pode ser acoplada à DLLME (LEONG; FUH; HUANG, 2014); (VIÑAS *et al.*, 2014). Por exemplo, Asadollahi e seus colaboradores (2010) aplicaram SFO-DLLME para a extração de vanádio a partir da salsa, um alimento natural o qual é fonte desse metal (ASADOLLAHI; DADFARNIA; SHABANI, 2010).

Geralmente, os estudos pesquisados descrevem a utilização de DLLME no modo convencional, ou seja, pela agitação manual ou com agitador automático, porém outras técnicas têm auxiliado no aumento da eficiência do procedimento, dentre elas estão à extração assistida por ultrassom (UAE, do inglês *ultrasound assisted extraction*), extração assistida por micro-ondas (MAE, do inglês *microwave assisted extraction*), as quais atuam aumentando o efeito do solvente dispersor e no caso do uso de micro-ondas auxilia na retirada de interferentes do extrato. De acordo com Asensio-Ramos *et al.* (2011), a eliminação do solvente dispersor pode ser benéfica para o método, pois ele, muitas vezes diminui o coeficiente de partição dos analitos desfavorecendo a extração. Desta forma, frequentemente, ultrassons são utilizados para auxiliar a extração e para formar uma emulsão de óleo em água adequada, onde os analitos se dispersam adequadamente entre a amostra aquosa e o solvente de extração. Esta abordagem aumenta a área interfacial entre a fase aquosa e a fase orgânica, sem a ajuda de um solvente de dispersão. Em relação aos trabalhos na literatura aplicada ao campo de análise de alimentos, alguns autores consideram a técnica como um novo método diferente da DLLME, a chamada microextração de emulsificação assistida por ultrassom (USAEME) (FONTANA *et al.*, 2009). No entanto, devido à semelhança de operação, outros autores denominaram de DLLME assistida por ultrassom (USA-DLLME, do inglês *ultrasound assisted-DLLME*). Na análise de alimentos, esta modificação foi realizada utilizando solventes como tetracloreto de carbono para a extração de imidacloprida a partir de extratos de tomate (QIAO *et al.*, 2010) e clorobenzeno para extrair agrotóxicos organofosforados a partir de suco de laranja (JIA *et al.*, 2010).

Uma outra alternativa que obedece aos preceitos da química verde é o uso de líquidos iônicos (ILs, do inglês *ionic liquids*) como substituinte dos solventes extratores ou dispersores orgânicos. O uso de ILs na técnica de DLLME se fundamenta em suas propriedades físico-

químicas únicas, que dependem da natureza e dimensão da sua constituição catiônica e aniônica. Essas propriedades incluem a pressão de vapor muito baixa, boa estabilidade térmica, viscosidade variável, miscibilidade com solventes aquosos e orgânicos, e características ambientalmente amigáveis para extração. Logo, esses solventes possuem menor toxicidade e volatilidade em relação aos solventes halogenados convencionais (LIU; JIANG; JÖNSSON, 2005). No entanto, apenas alguns ILs têm sido utilizados com este objetivo, pois necessitam apresentar baixa solubilidade em água, entre eles: 1-hexil-3-metilimidazol hexafluorofosfato [HMIM] [PF6], 1-butil-3-metilimidazol hexafluorofosfato [BMIM] [PF6], 1,3-dibutilimidazol hexafluorofosfato [BBIM] [PF6], 1-hexilpiridínio hexafluorofosfato [HPY] [PF6], 1-hexil-3-metilimidazol bis (trifluorometilsulfonil) imida [HMIM] [Tf2N]) (ASENSIO-RAMOS *et al.*, 2011; VIÑAS *et al.*, 2014). A primeira aplicação da técnica de IL-DLLME foi desenvolvida por Ravelo-Pérez e colaboradores os quais desenvolveram um método de extração por IL-DLLME para análise de oito agrotóxicos de diferentes classes em amostras de bananas (RAVELO-PÉREZ *et al.*, 2009b) e uvas e ameixas (RAVELO-PÉREZ *et al.*, 2009a). A mesma técnica também foi desenvolvida e aplicada para análise de agrotóxicos (herbicidas-triazinas) em amostras de mel (WANG *et al.*, 2010), feniluréia e triazinas em leite (GAO *et al.*, 2010) e agrotóxicos organofosforados em pera (HE *et al.*, 2010).

2.2.4.4 Aplicações da técnica de DLLME para análise de agrotóxicos e micotoxinas em alimentos

A aplicação da técnica de DLLME como preparo de amostra para análise matrizes alimentícias está bem descrita na literatura. Vários estudos abordam a análise de agrotóxicos (32 artigos) e alguns estão relacionados com extração de micotoxinas em alimentos (14 artigos) por DLLME. Esta revisão foi concentrada nesses tipos de analitos, pois os mesmos foram utilizados para aplicação da técnica desenvolvida no presente trabalho.

Na Tabela 2 foram resumidas informações dos estudos relevantes quanto à análise de agrotóxicos e micotoxinas em alimentos separados e quantificados por cromatografia líquida.

Tabela 2. Resumo dos trabalhos encontrados referentes ao uso da técnica de DLLME para análise de agrotóxicos e micotoxinas em alimentos detectados por cromatografia líquida

(Continua)

Análitos	Matriz	Pré tratamento da amostra	Técnica de microextração	Método de separação	Método de detecção	Solvente		Recuperação (RSD)	Faixa linear (LOD)	Referência
						Extrator	Dispensor			
Agrotóxicos										
5 Triazinas	Mel	Diluição com água e filtração	IL-DLLME	LC-C18, gradiente água-acetonitrila	DAD	175 µL [C6MIm][PF6]	50 µL 10 % Triton X-114	60-133 %	30-800 µg/kg (0,4-16,5 %)	(WANG <i>et al.</i> , 2010)
Dietofencarbo e pirimetanil	Polpa de maçã e casca	MAE com acetonitrila	DLLME-SFO	LC-C18, água-metanol (70:30)	DAD	10 µL undecanol	0,4 mL do extrato com acetonitrila	84-101 %	8-400 µg/kg (1,2-1,6 µg/kg)	(ZHOU <i>et al.</i> , 2011)
7 Fungicidas	Vinho tinto	Filtração	UA-IL-LPME	LC-C18, gradiente água-metanol	DAD	50 µL [C6MIm][PF6]	Ultrassom por 5 min	76-90,4 % (5,1-9,9 %)	0,05-2 mg/L (2,8-16,8 µg/L)	(WANG <i>et al.</i> , 2011)
4 Inseticidas piretróides	Mel	Diluição com água e filtração	UA-IL-DLLME (comparado com TC-IL-DLLME)	LC-C18 acetonitrila-água (70:30)	DAD	60 µL [C8MIm][PF6]	200 µL metanol	101-103 % (3,2-5,6 %)	0,5-200 µg/L (0,21-0,38 µg/L)	(ZHANG <i>et al.</i> , 2011)
Carbamatos e organofosforados	Água e suco de frutas	Centrifugação e Diluição com água (1:1)	DLLME	LC-C18, metanol-água (70:30)	FLD	15 µL tetracloreto	1 mL acetonitrila	80-118 % (1,4-2,7 %)	0,1-1000 ng/mL (12,3-16 pg/mL)	(FU <i>et al.</i> , 2009)
Dietofencarbo e pirimetanil	Suco de frutas	Centrifugação, Filtração e Diluição com água (1:1)	UASEME	LC-C18, metanol-água (75:25)	DAD, ESI-MS	20 µL tetracloreto de carbono	Tween 80	86-117 % (8 %)	0,05-2000 µg/L (0,01 µg/L)	(CHENG <i>et al.</i> , 2011)
Carbamatos	Água e suco de frutas		UASEME	LC		Clorobenzeno e clorofórmio	Mistura de SDS e CTAB	81-112 %	2-5000 µg/L (0,1-5,0 µg/L)	(VICHAPONG; BURAKHAM, 2012)
4 Fungicidas estrobilurinas	Suco de frutas	Centrifugação, Filtração e Diluição com água (1:1)	UASEME-SFO	LC-C18, metanol-água (70:30)	UV	30 µL 1-undecanol	Tween 80	82,6-97,5 % (3-6,2 %)	5-10000 ng/mL (2-4 ng/mL)	(LIANG <i>et al.</i> , 2013)
6 Carbamatos	Maçã	Centrifugação e Diluição com água	DLLME	MEKC, 10 m mol/L H ₃ PO ₄ (pH 2,5) com 50 mM SDS e 25 % metanol	DAD	60 µL clorofórmio	1 mL acetona	85-113 % (3-8,3 %)	6-500 ng/g (2-3 ng/g)	(ZHANG <i>et al.</i> , 2010)
Inseticidas neonicotinóides	Pepino	Homogeneização e Centrifugação	DLLME	MEKC	DAD	100 µL clorofórmio	0,8 mL acetonitrila	(6,3 %)	2,7-200 ng/g (0,8-1,2 ng/g)	(ZHANG <i>et al.</i> , 2012b)
6 Inseticidas piretróides	Suco de frutas	Filtração	DLLME	LC-C18 acetonitrila-água (72:28)	UV	300 µL clorofórmio	1,25 mL metanol	84-94 % (0,7-5,2 %)	2-1500 µg/L (2-5 µg/L)	(BOONCHIANGMA; NGEONTAE; SRIJARANAI, 2012)

(continuação)

12 Carbamatos	Sucos (banana, abacaxi e tomate)	Concentração da amostra no capilar baseado no método de varredura	DLLME	MEKC (capilar), 100 m mol/L tampão borato – 50 m mol/L SDS (pH 9,0) com 5 % acetoni-trila	DAD	800 µL clorofórmio	1,5 mL metanol	78-105 % (9 %)	10-1000 µg/L (1–7 µg/L)	(MORENO-GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2011)
19 Agrotóxicos de classes diferentes	Pepino orgânico e tomate	Extração por QuEChERS	DLLME	LC	MS/MS	Tetracloroeto de carbono	Extrato do QuEChERS	86-104 % (12 %)	(3,4-10,4 µg/kg)	(DASHTBOZORGI; RAMEZANI; WAQIF-HUSAIN, 2013)
13 Agrotóxicos de classes diferentes	Tomate	Extração por QuEChERS com acetoni-trila e limpeza por DSPE	DLLME	LC-C18, gradiente tampão pH 3 ác. fórmico/formato de sódio:acetoni-trila	DAD	400 µL clorofórmio	1 mL extrato de acetoni-trila	86-116 % (15 %)	(0,0017-0,045 mg/kg)	(MELO <i>et al.</i> , 2013)
7 Inseticidas neonicotinóides	Grãos: arroz integral, milho e aveia	Extração com acetoni-trila DSPE com PSA e cartucho C18 com nanotubos de carbono e eluição com acetoni-trila	DLLME	LC-C18, acetoni-trila–0,3 % ác.fórmico (20:80)	DAD	2 mL clorofórmio diclorometano (1:1)	1 mL extrato de acetoni-trila	76-123% (12,6 %)	0,03-3 µg/mL (0,002-0,005 mg/kg)	(WANG <i>et al.</i> , 2012b),
39 Agrotóxicos	Ginseng	Extração acetoni-trila aplicando o método de QuEChERS	DLLME	UHPLC-C18, gradiente, acetoni-trila 0,1 % ác. fórmico	MS/MS, SRM nos modos (+ ; -)	100 µL clorofórmio	1 mL extrato com acetoni-trila	70-120 %	(0,01-1,0 µg/kg)	(CHEN <i>et al.</i> , 2013)
5 Inseticidas neonicotinóides	Mel	SPE com cartuchos C18 e eluição com 1,5 mL acetoni-trila	DLLME	LC-C18, gradiente acetoni-trila-ác. fórmico 20:80 to 45:55	DAD, APCI(+)/IT-MS/MS, SIM	100 µL clorofórmio	1,5 mL acetoni-trile extract	90-104 %	DAD: (0,2-1 ng/g). MS/ MS: (0,02-0,13 ng/g)	(CAMPILLO <i>et al.</i> , 2013b)
N-metil carbamatos	Tomate, pepino, cenoura, e alface	Centrifugação e Filtração	DLLME	LC-C18, acetoni-trila-água (35:65)	DAD	80 µL clorofórmio	1 mL acetoni-trila	98.2 % (2,9-7,5 %)	10-300 mg/kg (0,5-3,0 mg/kg)	(LIN <i>et al.</i> , 2011)
3 Agrotóxicos organofosforados	Frutas e suco de frutas	Centrifugação, Filtração e Diluição com água (1:1)	DLLME	LC-C18, 100 % metanol	DAD	250 µL clorofórmio	1,5 mL metanol	(2,2-4,1 %)	10-4000 ng/mL (2–3 ng/mL)	(FARAJZADEH <i>et al.</i> , 2011)
6 Agrotóxicos organofosforados	Maçã e pera	Diluição em água com base de IL	VA-DLLME	LC-C18, metanol-água (70:30)	DAD	50 µL [C8MIm][PF6]	1 mL metanol	70-109 % (2,3-5,7 %)	2-100 µg/kg (0,061-0,73 µg/kg)	(ZHANG <i>et al.</i> , 2012a) S
4 Agrotóxicos	Água e	Extração, Filtração e	IL-DLLME	LC-C18, metanol-água	UV	50 µL	0,60 mL metanol	91-109 %	5-1000 µg/L	(HE <i>et al.</i> , 2010)

(continuação)

organofosforados	frutas	Diluição (1:3) dos sucos		(72:28)		[C4BIm][PF6]		(1,1-2,7 %)	(0,01-0,05 µg/L)	
8 Agrotóxicos multiclasses	Uvas de mesa e ameixas	Homogeneização e extração em UA com acetonitrila	IL-DLLME	LC-C18, gradiente água-acetonitrila	DAD	88 mg [C6MIm][PF6]	714 µL Metanol	66-105 % (<9,1 %)	(0,651-6,33 µg/kg)	(RAVELO-PÉREZ <i>et al.</i> , 2009a)
Carbamatos	Maçã e pepino	Tratamento com NaCl e MgSO ₄ . SPE com cartuchos C18 e eluição com acetonitrila	DLLME	LC	UV	35 µL clorofórmio	1 mL acetonitrila	(1,5-8,8 %)	25-100 µg/kg (5-60 pg/kg)	(ZHOU <i>et al.</i> , 2012)
5 Inseticidas neonicotinóides	Tomate e pepino	Extração com acetonitrila MgSO ₄ e NaCl. Limpeza com DSPE multicamada com nanotubos de carbono e PSA	DLLME	LC-C18, metanol-água (40:60)	DAD	200 µL clorofórmio	2,5 mL do extrato limpo	85-97,5 % (3,6-5,8 %)	5-300 ng/g (0,5-1,0 ng/g)	(WU <i>et al.</i> , 2011)
Fipronil	Mel	Diluição com água e filtração	DLLME (comparado com QuEChERS)	LC-C18, gradiente acetonitrila-água	DAD	100 µL tetracloreto de carbono	2 mL acetonitrila	71-101 % (7,1-11,2 %)	0,03-0,25 mg/kg (0,03 mg/kg)	(TOMASINI <i>et al.</i> , 2011)
5 Carbamatos	Melancia e tomate	Extração	DLLME	LC	DAD			76-95 % (9,6 %)	10-1000 ng/g (0,5-1,5 ng/g)	(LIU <i>et al.</i> , 2012)
5 Lactonas macrocíclicas	Leite	Precipitação de proteínas com TFA	DLLME	LC-C18, acetonitrila-água (75:25)	DAD, APCI(-)IT-MS/MS SIM	200 µL clorofórmio	2 mL acetonitrila		(0,1-2,4 ng/g)	(CAMPILLO <i>et al.</i> , 2013a)
7 Inseticidas neonicotinóides	Mel	Diluição com água e filtração	DLLME	LC-C18, acetonitrila-0,1 % ác. fórmico (20:80)	MS/MS, SRM(+)	2,0 mL diclorometano	0,5 mL acetonitrila	74,3-113,9 % (2,74-11,8 %)	(0,5-1,0 µg/kg)	(JOVANOVA <i>et al.</i> , 2013)
8 Agrotóxicos	Bananas	Homogeneização e extração UA com acetonitrila	IL-DLLME	LC-C18, gradiente água-acetonitrila	DAD	88 mg [C6MIm][PF6]	714 µL metanol	69-97 % (<8,7 %)	(0,320-4,66 µg/kg)	(RAVELO-PÉREZ <i>et al.</i> , 2009b)
7 Fungicidas	Sucos de frutas	Diluição com água (1:1) e filtração	IL-DLLME	LC-C18, gradiente metanol-água	DAD	60 µL [C6MIm][PF6]	0,50 mL metanol	66-93 % (12 %)	0,02-2 mg/L (3,1-10,2 µg/L)	(WANG <i>et al.</i> , 2013)
Imidacloprida	Tomates	Centrifugação, Filtração e Diluição com água (1:1)	UA-DLLME	LC-C18, metanol-água (35:65)	UV	30 µL tetracloreto etanol	Ultrassom por 10 min.	88-110 % (<3,4-8,9 %)	6-100 µg/L (0,045 mg/kg)	(QIAO <i>et al.</i> , 2010)
Propoxur	Bebidas	Filtração e Diluição com água 50 vezes	USAEME	LC-C18, metanol-água (50:50)	DAD	40 µL tetracloreto de	Ultrassom por 60°C	93-106 % (1,5-6,2 %)	0,01-10 µg/mL (1 ng/mL)	(WU; XIANG; XIA, 2009)

(continuação)

carbono										
Micotoxinas										
Aflatoxinas B1, B2, G1, e G2	Milho, arroz, e produtos de trigo	Extração metanol-água(8:2)	DLLME (comparação com limpeza por IAC)	LC	FLD	220 µL clorofórmio	1 mL extrato com metanol	70-110 % (<10 %)	0,1-20 ng/mL (0,01-0,17 µg/kg)	(CAMPONE <i>et al.</i> , 2011)
Desoxinivalenol	Farinha de trigo	Diluição com água e limpeza com IAC	DLLME	LC-C18, água-acetonitrila-metanol (88:6:6)	DAD	0,25 mL clorofórmio	0,8 mL acetonitrila	73 %	50-1000 µg/L (125 µg/kg)	(KARAMI-OSBOO <i>et al.</i> , 2013)
Ocratoxina A	Cereais	Extração com metanol	pH-DLLME	LC-C18, 1 % ác. acético-acetonitrila (60:40)	FLD	400 µL tetracloroeto de carbono ou 150 µL 1,2-dibromoetano	1 mL extrato com metano	81-90 %	(0,019 µg/kg)	(CAMPONE <i>et al.</i> , 2012)
Patulina	Suco de maçã	Filtração	DLLME	MEKC, tetraborato de sódio, pH 9 com HCl	DAD	1 mL clorofórmio	1 mL 2- propanol	75 % (9 %)	(0,6 µg/L)	(VÍCTOR-ORTEGA <i>et al.</i> , 2013)
Ocratoxina A	Vinho	Filtração	DLLME	LC-C18 capilar, água (2 % ác. acético, 0,2 mol/L SDS)– metanol (30:70)	LIF	660 µL clorofórmio	940 µL acetonitrila	92-98,1 %	(5,5 ng/L)	(ARROYO-MANZANARES; GÁMIZ-GRACIA; GARCÍA-CAMPAÑA, 2012)
Patulina	Suco de maçã e Sucos concentrados	Diluição	DLLME	LC-C18, água-acetonitrila (90:10)	DAD	50 µL clorofórmio	1 mL acetonitrila	94-97 % (5,9 %)	8-40 µg/L (4 µg/L)	(FARHADI; MALEKI, 2011)
Zearalenona	Cerveja		DLLME	TLC e LC		clorofórmio	Acetonitrila	71-108 %	4-120 pg/µL (0,12 pg/µL)	(ANTEP; MERDIVAN, 2012)
Ocratoxina A	Vinho	Filtração	DLLME	LC-C18 0,1 % ác. formico-acetonitrila (55:45)	ESI(+)-MS/MS	100 µL clorofórmio	1 mL acetona	97-102 % (5,8 %)	0,5-200 ng/mL (0,005 ng/mL)	(CAMPONE; PIZZINELLI; RASTRELLI, 2011)
Ocratoxina A	Vários alimentos e vinhos	Diluição com ác. fosfórico (comparação com QuEChERS)	IL-DLLME	LC-C18, 2 % ác. acético 0,2 M, SDS– metanol (30:70)	LIF, He–Cd excitação do laser a 325 nm	100 mg [C6MIm][PF6]	700 µL metanol	89-94 % (8,5 %)	0,0175-4 µg/L (5,2 ng/L)	(ARROYO-MANZANARES; GARCÍA-CAMPAÑA; GÁMIZ-GRACIA, 2011)
Desoxinivalenol e de-epoxi-deoxinivalenol	Milho e carne de suínos	homogeneização e Limpeza com IAC e SPE	SI-USAEME	UHPLC, acetonitrila-água (10:90)	MS/MS			73-85 % (9,2-9,4 %)	30-1000 µg/kg (4,2-6,2 µg/kg)	(LI <i>et al.</i> , 2013)
Multitoxinas	Nozes e	Moagem,	DLLME	UHPLC- C18,	MS/MS (ESI	620 µL	950 µL	60,7-104,3%	0,57-5000 µg/kg	(ARROYO-

(conclusão)

	sementes comestíveis	homogeneização, extração com acetonitrila e QuEChERS Moagem,		gradiente água-metanol (ác fórmico 0,3 % e 5 m mol/L formiato de amônio)	+) (MRM)	clorofórmio	acetonitrila	(<11%)	(0,17-45,1 µg/kg)	MANZANARES <i>et al.</i> , 2013)
Multitoxinas	Sementes e extrato de <i>Silybum marianum</i>	homogeneização, extração com tampão fosfato pH 7,1 e acetonitrila com 5% ác. fórmico e QuEChERS Extração	DLLME	UHPLC- C18, gradiente água-metanol (ác fórmico 0,3 % e 5 m mol/L formiato de amônio)	MS/MS (ESI +) (MRM)	620 µL clorofórmio	950 µL acetonitrila	62,3-98,9%, (<10%)	1,5-6000 µg/kg (0,45-459 µg/kg)	(ARROYO-MANZANARES; GARCÍA-CAMPAÑA; GÁMIZ-GRACIA, 2013)
Aflatoxinas B1, B2, G1, e G2	Óleos comestíveis	metanol:água (6:4) com NaCl, diluição em água e filtração. Limpeza em IAC Homogeneização,	DLLME	LC-C18 acetonitrila-metanol-água (2:3:6)	FLD	120 µL clorofórmio	500 µL acetonitrila	96-110% (2,9-7,8%)	0,001-6 ng/mL (0,1-5,3x 10 ⁻³ ng/mL)	(AFZALI <i>et al.</i> , 2012)
Aflatoxinas B1 e B2 e Ocratoxina A	Arroz	extração com acetonitrila-água-etanol (79:20:1) em ultrassom	DLLME	LC-C18 gradiente acetonitrila-metanol-ác. fosfórico 1%	FLD	200 µL clorofórmio	1 mL extrato com acetonitrila	82,9-112% (<7,9%)	0,05-10 µg/kg (0,06-0,5 µg/kg)	(LAI <i>et al.</i> , 2014a)

[BBIM][PF6], 1,3-dibutilimidazolio hexafluorofosfato; [BMIM][PF6], 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato; [HMIM][PF6] – 1-hexil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato; [HMIM][TF2N] – 1-hexil-3-metilimidazolio bis(trifluorometil-sulfonil)imida; [HPy][PF6] – 1-hetilpiridínio hexafluorofosfato; APCI – Ionização Química a Pressão Atmosférica; LC-C18 – Cromatografia Líquida de Fase Reversa; CTAB, Brometo de N-cetil-N-N-trimetil amônio; DAD - Detecção por Arranjo de Diodos; DLLME - Microextração Líquido-Líquido Dispersiva; DSPE – Extração Dispersiva em Fase Sólida; EI - Impacto de Elétrons; ESI – Ionização por Eletrospray; FLD- Detecção por Fluorescência; IAC – Coluna de Imunoafinidade; IL- Líquidos Iônicos; IT – Armadilha de íons; LC-MS/MS - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial; LIF – Fluorescência Induzida por Laser; LOD - Limite de detecção; LPME – Microextração em fase líquida; MAE – Extração Assitida por Microondas; MeCN – Acetonitrila; MEKC – Cromatografia Eletrocínética; PSA – Amina primária/ secundária; QuEChERS – Extração Rápida, Fácil, Barata, Efetiva, Robusta e Segura; R(%) - Ensaio de recuperação; RSD(%) - Desvio Padrão Relativo; SDS – Dodecil Sulfato de Sódio; SFO – Gota Orgânica Flutuante Solidificada; SI – Injeção lenta; SIM – Monitoramento por Seleção de Íon; SPE - Extração em Fase Sólida; TC – Temperatura Controlada; TLC – Cromatografia em Camada Delgada; UA-DLLME – Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Assistida por Ultrassom; UHPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Alta performance; USAEME – Microextração por Emulsificação Assistida por Ultrassom; UV – Detecção por Ultravioleta; VA- Extração assitida por Vortex.

Com base na **Tabela 2**, observa-se que as principais classes de agrotóxicos determinadas pela técnica de DLLME e quantificados por cromatografia líquida, são: carbamatos, organofosforados, piretróides, neonicotinóides, estrobilurinas, fungicidas, lactonas macrocíclicas, triazinas, além de trabalhos que estudaram multiclases. Entre as classes de micotoxinas determinadas destacam-se: ocratoxina A, patulina, aflatoxinas, zearalenona, desoxinivalenol além de métodos multitoxinas.

Viñas *et al.* (2014) efetuaram um levantamento bibliográfico no qual foram compilados 75 estudos referentes à pesquisa de compostos orgânicos por DLLME-cromatografia líquida. Destes, 32 referem-se à análise de agrotóxicos e 9 de micotoxinas. Além disso, 56 artigos são referentes a estudos com cromatografia gasosa sendo 22 com aplicação para agrotóxicos. De acordo com os mesmos autores, as principais amostras analisadas são sucos de frutas, frutas e legumes, cerveja, vinho, mel, ovo, leite e derivados, azeites, cereais e grãos, tecidos animais, alimentos infantis, entre outros.

Com relação aos tratamentos prévios à aplicação da técnica de DLLME, observou-se que são escassos os estudos os quais não realizam nenhum tratamento anterior à microextração para análise em alimentos. As combinações com DLLME são essencialmente obrigatórias, uma vez que a técnica não é seletiva ou apresenta baixa seletividade para os analitos estudados. Na **Tabela 3** podem ser observadas as principais configurações e combinações utilizadas para a técnica de DLLME.

Tabela 3. Principais configurações e combinações de técnicas de extração e preparo de amostra com DLLME encontradas na literatura

Configurações	Combinações
DLLME convencional	SPE-DLLME(a)
SFO-DLLME	IAC-SPE-DLLME(b)
IL-DLLME	DSPE-DLLME (c)
USA-DLLME	QuEChERS-DLLME (d)

Fonte: (a) Zhou *et al.*, 2012; (b) Li *et al.*, 2013; (c) Wu *et al.*, 2011; (d) Arroyo-Manzanares *et al.*, 2013.

Para alimentos sólidos, observou-se que outras etapas anteriores à aplicação da DLLME são requeridas. Entre elas destacaram-se, homogeneização, extração líquido-líquido, limpeza com cartuchos de SPE. Já para amostras líquidas etapas como filtração, diluição e degaseificação são comumente utilizadas anteriores ao procedimento de DLLME.

Também se verificou que diferentes técnicas de preparo de

amostra são utilizadas sequencialmente à DLLME, entre elas QuEChERS, (ARROYO-MANZANARES; GARCÍA-CAMPAÑA; GÁMIZ-GRACIA, 2013) SPE e IAC (LI *et al.*, 2013), UAE (QIAO *et al.*, 2010); ZHANG *et al.*, 2011), SFO (ZHOU *et al.*, 2011) LIANG *et al.*, 2013) e VA (ZHANG *et al.*, 2012a).

É importante ressaltar que neste trabalho, pela primeira vez, foi utilizada a associação da técnica de DLLME com a metodologia de HF-LPME. Com o objetivo de finalizar essa revisão, na próxima seção serão apresentadas algumas características dos analitos os quais foram alvos de estudos para o desenvolvimento da técnica de microextração.

2.3 ANALITOS ESTUDADOS

2.3.1 Aflatoxinas (AFLs)

As AFLs constituem um grupo de metabólitos secundários tóxicos produzidos principalmente pelas espécies de *fungos Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*. Os fungos produtores de AFLs podem crescer em determinados alimentos, sob circunstâncias favoráveis de temperatura e umidade, e gerar AFLs antes e/ou durante a colheita e durante o armazenamento (GIRAY *et al.*, 2007). Os principais alimentos susceptíveis à contaminação por AFLs são: amendoim, milho, frutas secas, figos, cereais, soja, painço, nozes, avelãs, sorgo, trigo, entre outros (KOS; KRŠKA, 2006; SCUSSEL, 2002; SILVA, 2005).

AFLs têm se mostrado altamente tóxicas, demonstrando ter efeitos carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos. A intoxicação por essa toxina é denominada de aflatoxicose. A AFB1 é o composto com maior potencial toxigênico (hepatocarcinogênico) conhecido em mamíferos, por isso a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classificou essa toxina como carcinógeno humano do Grupo I. Portanto, mesmo a exposição crônica na dieta a pequenas quantidades desse composto deve ser considerada prejudicial à saúde humana (CALONI *et al.*, 2006; GIRAY *et al.*, 2007).

Neste grupo de micotoxinas, cerca de 20 metabólitos derivados já foram relatados, porém as principais toxinas identificadas são aflatoxina B1 (AFB1), aflatoxina B2 (AFB2), aflatoxina G1 (AFG1) e aflatoxina G2 (AFG2). As iniciadas B e G se devem ao fato destes compostos apresentarem fluorescência azulada e esverdeada, respectivamente, quando observados sob luz ultravioleta (IARC, 2002).

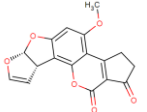
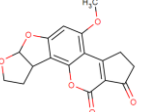
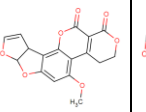
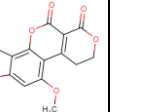
Dentre as 4 principais AFLs, a AFB1 é a mais importante, devido

à sua elevada hepatotoxicidade e maiores concentrações nos substratos. A forma ativada da AFB1 é o composto identificado como 8,9-epóxido de AFB1, originado através da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bifuranóide da molécula de AFB1, sendo esta reação mediada pelo sistema do citocromo P450, no fígado. Este composto é altamente eletrofílico e capaz de reagir rapidamente, através de ligações covalentes, com sítios nucleofílicos de macromoléculas, como ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) e proteínas. A ligação da AFB1-epóxido com o DNA modifica a sua estrutura e, conseqüentemente, sua atividade biológica, originando assim os mecanismos básicos dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos da AFB1 (HAYASHI, 2007).

Os efeitos metabólicos de 8,9-epóxido de AFB1 incluem: inibição da síntese proteica, DNA e RNA, redução de atividade enzimática, depressão do metabolismo de glicose, inibição de síntese de lipídeos, fosfolipídios, ácidos graxos livres, entre outros. Já o aumento do risco de desenvolvimento de hepatocarcinoma é devido às mutações no gene de supressão tumoral P53 e pela ativação de oncogenes dominantes (GIRAY *et al.*, 2007).

Algumas características físico-químicas, espectrais e estruturais podem ser observadas na Tabela 4.

Tabela 4. Características físico-químicas e espectrais das 4 aflatoxinas estudadas

Aflatoxina	B1	B2	G1	G2
Estrutura química				
Massa Molar (g mol ⁻¹)	312	314	318	320
Absorção no UV	13400 21800	9200 14700	10000 16100	11200 19300
Emissão Max. de Fluorescência	425 nm	425 nm	450 nm	450 nm
Log P	1,58	1,57	1,37	1,36
Log D	1,65	1,63	1,39	1,37

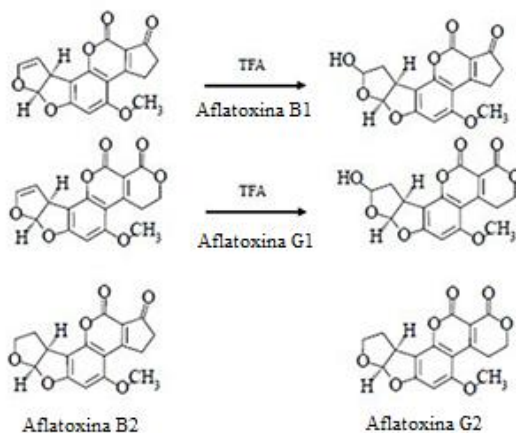
Fonte: PUBCHEM (2015); CHEMICALIZE e CHEMSPIDER (2015).

Quimicamente as AFLs são derivados de difuranocumarínicos, ou seja, as estruturas químicas são caracterizadas por ligações de diidrofurano ou tetraidrofurano a uma estrutura cumarínica (KAWASHIMA, 2004). As aflatoxinas são substâncias cristalinas, muito solúveis em solventes moderadamente polares, tais como clorofórmio, metanol, acetona e dimetil sulfoxido e ligeiramente solúvel em água (10-30 mg/L), éter de petróleo e hexano (FAMIC, 2014).

Quanto à estabilidade das aflatoxinas observa-se que suas moléculas são instáveis à pH extremos de (< 3, > 10). Desta forma, como é facilmente degradável em condições alcalinas, bem como em condições fortemente ácidas, a análise das aflatoxinas deve ser realizada em pH entre 4 e 6 (FAMIC, 2014).

Outra característica importante das aflatoxinas é a capacidade de sofrer hidroxilação quando em condições ácidas, sendo que em presença de ácidos fortes as aflatoxinas B1 e G1 são convertidas em aflatoxinas B2a e G2a pela adição catalítica de um grupo hidroxil, através da ligação dupla do anel furano (**Figura 6**). Essa reação altera as propriedades cromatográficas dos analitos quanto suas características de fluorescência. O processo de adição de um ácido forte, como por exemplo, o ácido trifluoroacético tem sido utilizado como mecanismo de derivatização das aflatoxinas, com aumento da detectabilidade por fluorescência (TAKAHASHI, 1977; TARTER; HANCHAY; SCOTT, 1984; TRUCKSESS *et al.*, 2006).

Figura 6. Reação de derivatização das Aflatoxinas B1 e G1 com ácido trifluoroacético



Fonte: Jascoinc.com (2015).

Além disso, o anel lactona presente na estrutura das AFLs torna-as susceptíveis à hidrólise alcalina, porém se o tratamento alcalino é leve, a acidificação pode reverter a reação e as estruturas originais das aflatoxinas podem ser obtidas. Outra propriedade que esses compostos possuem é a sensibilidade à exposição à luz ultravioleta ou visível, e pela reação com agentes oxidantes, os quais provocam a perda das propriedades fluorescentes e decomposição dessas substâncias (IARC, 2002).

Devido à periculosidade dessa classe de micotoxinas, os órgãos reguladores têm se preocupado em atualizar constantemente a legislação que regulamenta os limites máximos de resíduos permitidos de AFLs em alimentos. Cabe ressaltar, que não existem LMR para AFLs em suco de soja, porém foram pesquisados alguns limites para fins comparativos.

No Brasil, os limites máximos de resíduos tolerados para micotoxinas em alimentos foram preconizados pela RDC N° 7 de Fevereiro de 2011. Nesta resolução o artigo 3º, regulamenta que os LMR devem ser aplicados também às leguminosas e seus derivados. Porém, não há especificação para soja e/ou seus derivados, exceto para fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância (BRASIL, 2011), a qual pode ser interpretada para alimentos desses segmentos que contenham soja na formulação. Alguns países estabelecem um LMR para AFLs em farelo de soja, Argentina e o Uruguai estabelecem o limite de $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ para AFB1 em farinha de soja, enquanto para a República Dominicana a tolerância é zero para AFB1 em qualquer produto a base de soja (FAO, 1997). A China determina um limite $< 30 \mu\text{g kg}^{-1}$ para AFB1 em farelo de soja.

É importante destacar, que essa classe de micotoxinas é capaz de contaminar um grande número de alimentos, desde as matérias-primas, produtos e subprodutos. Dentre eles destacam-se os cereais, grãos e sementes como arroz, milho, soja, trigo, aveia, centeio, sorgo, feijão, amendoim, óleos, especiarias, leites e derivados, entre outros. A soja (*Glycine max* L.) é uma leguminosa a qual possui em sua composição proteína de alta qualidade sendo comparada como a melhor fonte de proteína de origem vegetal (LIU, 1997; HASSAN, 2003; WANG, YU, CHOU, 2004). Neste contexto, sendo o Brasil um grande produtor e exportador de soja e seus derivados, é imprescindível o controle de qualidade na produção dessa leguminosa e seus derivados (SEIBEL *et al.*, 2003; CARRÃO-PANIZZI; MANDARINO, 1998).

Dentre os produtos derivados da soja disponíveis para consumo humano no Brasil estão o leite de soja e suas variantes flavorizadas

como sucos e vitaminas. Por ser fonte barata de proteína de alta qualidade, ácidos graxos insaturados, lecitina e isoflavonas de bom valor nutritivo e de fácil obtenção, o extrato hidrossolúvel de soja apresenta-se como uma importante alternativa para a nutrição humana em geral, particularmente, nos lugares onde o leite bovino é caro ou indisponível. Além disso, tem sido utilizado por pessoas alérgicas ou intolerantes à lactose e/ou à proteína presentes no leite bovino (CABRAL *et al.*, 1997; MURARO; GIAMPIETRO; GALLI, 2002; ROSENTHAL *et al.*, 2003).

2.3.2 Agrotóxicos

O Brasil é grande produtor e consumidor de frutas e hortaliças e o desenvolvimento dessas culturas tornou-se necessário para a garantia de abastecimento do mercado. Desta forma, o uso de agrotóxicos tem sido empregado para combate pragas e prevenção de perdas da produção agrícola (FELEMA; RAIHER; FERREIRA, 2013). Apesar da importância econômica que o uso de agrotóxicos desempenha na economia brasileira e mundial, e sendo o Brasil um dos maiores produtores e consumidores de agrotóxicos do mundo, deve-se ressaltar que tais substâncias possuem potencial tóxico para o homem e meio ambiente, sendo que seus resíduos podem ser encontrados amplamente distribuídos em alimentos, água e meio ambiente. Portanto, a avaliação de agrotóxicos em alimentos torna-se uma prática que deve ser regular e criteriosa no controle de tais substâncias (CALDAS; SOUZA, 2000; PRESIBELLA, 2004).

Os agrotóxicos são definidos como os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (BRASIL, 2002; REBELO; CALDAS, 2014).

Os agrotóxicos são classificados principalmente pelas características químicas dos compostos. Dessa forma, as principais classes de agrotóxicos existentes são: organoclorados, organofosforados, carbamatos, ditiocarbamatos, piretróides, triazóis, entre outros. Porém, nessa revisão serão abordados, rapidamente, os compostos utilizados para a presente pesquisa.

2.3.2.1 Organofosforados

Os agrotóxicos organofosforados (OF) são compostos amplamente utilizados como inseticidas e estão entre os mais tóxicos atualmente em uso na agricultura. Os organofosforados apresentam principalmente átomos de C e P em sua estrutura e normalmente são ésteres derivados do ácido fosfórico, ditiofosfórico e tiofosfórico (ECOBICHON, 2001).

Os agrotóxicos dessa classe são lipossolúveis e decompõem-se dentro de dias ou semanas e decorrente a esta característica a intoxicação aguda é mais frequentemente relatada. Os organofosforados possuem como mecanismo de ação tóxica, a inibição da ação da enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. O acúmulo deste neurotransmissor nas terminações nervosas leva a uma contínua estimulação dos receptores muscarínicos, atingindo o sistema nervoso autônomo parassimpático, seguida da estimulação dos receptores nicotínicos, atingindo o sistema simpático e sistema nervoso central (IPCS/INCHEM, 1986; ECOBICHON, 2001). Devido ao mecanismo de ação, são observadas disfunções neurocomportamentais, cognitivas e neuromusculares na intoxicação por agrotóxicos organofosforados. Cabe ressaltar, que a inibição da atividade da acetilcolinesterase, por esses compostos, é quase irreversível (ECOBICHON, 2001).

O Clorpirifós (O, O-dietil-O- 3,5,6, fosforotioato -triclora-2-piridil), um dos analitos estudados no presente trabalho, é um inseticida, acaricida, e nematicida organofosforado clorado com largo espectro. Esse agrotóxico é utilizado principalmente em culturas de arroz, trigo, algodão, frutas, legumes e ervas. Devido à sua alta volatilização e uso generalizado, clorpirifós representa uma das mais importantes fontes de exposição humana e ambiental durante a aplicação. Além disso, a sua elevada toxicidade para os seres humanos pode resultar em doenças graves, como câncer de próstata e problemas respiratórios (IPCS/INCHEM, 1999; 1983).

O clorpirifós possui baixíssima solubilidade em água, porém é muito solúvel em solventes como acetona, benzeno, tetracloro de carbono e clorofórmio; e moderadamente solúvel em etanol, metanol e tolueno (PUBCHEM, 2015).

A parationa metílica (O,O-dimetil O-4-nitrofenil fosforotioato), outro composto utilizado para o desenvolvimento da presente pesquisa, também é um inseticida e acaricida, pertencente à classe dos agrotóxicos organofosforados, o qual apresenta diversos riscos para saúde humana e

contaminação ambiental. Decorrente destes riscos, a FAO preconiza que a rotulagem de produtos a base de parationa metílica devam conter indicações de risco como: extremamente tóxico, perigoso para o ambiente, inflamável, tóxico em contato com a pele, muito tóxico se inalado ou ingerido, perigo de dano grave à saúde pela exposição prolongada, muito tóxico aos organismos aquáticos, e tóxico para abelhas (UNEP/FAO, 2005). Um aspecto importante da parationa metílica é que durante sua biotransformação é formado o metabólito paraoxona, que aumenta e prolonga os efeitos tóxicos desse princípio ativo (ANVISA, 2002). O uso da parationa metílica é indicado para aplicação foliar nas culturas de algodão, alho, arroz, batata, cebola, feijão, milho, soja e trigo.

O limite máximo de resíduo (LMR) tolerado para clorpirifós em culturas de uvas é de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$, já para parationa metílica não existem LMR para cultura de uvas ou vinhos conforme a legislação norte americana (US.EPA, 2011). Já a legislação da União Européia define o LMR para clorpirifós para uvas de mesa e vinhos em $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ e para parationa metílica em uvas de mesa e uvas para vinho o LMR é de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ (EC, 2008; 2012). No Brasil não existem LMR tolerados para clorpirifós e parationa metílica em cultura de uvas e derivados.

2.3.2.2 Triazóis

Os triazóis são inibidores da desmetilação, etapa na síntese do ergosterol, o anel triazol presente nas moléculas desta classe de agrotóxico é responsável por seu mecanismo de ação fungicida. A atividade fungicida é desempenhada pela inibição direta da enzima lanosterol 14-alfa-desmetilase (CYP51), responsável por uma das etapas de biossíntese do ergosterol – derivado do colesterol – e cuja ausência prejudica a fluidez e integridade das células dos fungos (ZARN *et al.*, 2003). Em seres humanos a enzima esterol 14-alfa-desmetilase é expressa em diferentes tecidos e, por isso, há a probabilidade que o mesmo mecanismo de ação fungicida seja também responsável por efeitos tóxicos observados em mamíferos. Entre os efeitos adversos observados nos estudos com animais de laboratório estão: efeitos reprodutivos, no desenvolvimento embrionário, hepatotoxicidade, hepatocarcinogenicidade, e produção de tumores na tireoide e testículos por via não-genotóxica (EFSA, 2009).

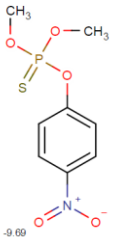
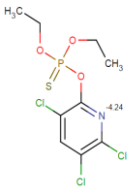
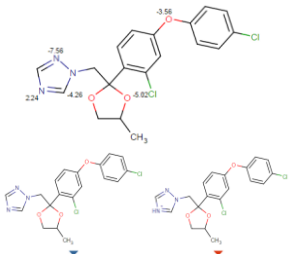
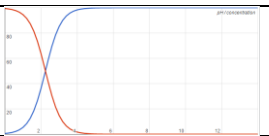
O difenoconazol (cis-trans-3-cloro-4-[4-metil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-2-il] fenil 4-clorofenil éter) é um

fungicida da classe triazol, sendo recomendado para controle de doenças em culturas de alface, banana, morango, uva, soja, algodão, milho entre outros (KONWICK *et al.*, 2006). Como ressaltado anteriormente, o composto provoca o rompimento da parede celular, controlando dessa forma, o crescimento de diferentes classes de fungos.

Para o difenoconazol, o LMR tolerado em culturas de uvas, conforme a legislação norte americana, é de 4 mg kg⁻¹ (US.EPA, 1999), e de acordo com a legislação da União Européia esse limite é de 3 mg kg⁻¹ (EC, 2015). No Brasil, a Anvisa determina o LMR para difenoconazol em culturas de uva 0,2 mg kg⁻¹ (ANVISA, 2008).

Na Tabela 5 são apresentadas algumas características físico-químicas dos agrotóxicos, parationa metílica, clorpirifós e difenoconazol.

Tabela 5. Características físico-químicas dos agrotóxicos estudados

Agrotóxicos	Parationa Metílica	Clorpirifós	Difenoconazol
Estrutura química			
Microespécies			
Solubilidade em água a 25°C (mg/L)	25	1,40	15
Log P	2,60	4,78	4,86
Log D	2,50	4,69	5,00
Ko/a	398	60256	72443

Log P = é referente apenas a espécie neutra (hidrofobicidade) Log D = é a distribuição das microespécies em qualquer pH (diferentes pHs)

Fonte: IPCS/INCHEM (1992); CHEMICALIZE (2015) e CHEMSPIDER (2015).

Após a apresentação dessa revisão de literatura, a qual abordou os principais assuntos pertinentes a este trabalho, a seguir são apresentados os objetivos da presente pesquisa.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Propor a combinação simultânea da microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), denominada HF-DLLME, como alternativa de preparo de amostra miniaturizado para a determinação de micotoxinas e agrotóxicos em sucos empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Otimizar as condições de extração para técnica de HF-DLLME na análise de aflatoxinas (AFB1, AFG1, AFB2 e AFG2) em amostras de sucos de soja por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência;
- ✓ Otimizar as condições de extração para técnica de HF-DLLME para a análise dos agrotóxicos (parationa metílica, difenoconazol e clorpirifós) em amostras de suco de uva por cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos;
- ✓ Determinar as figuras de mérito ou parâmetros analíticos para os métodos propostos;
- ✓ Comparar as eficiências de extração dos métodos propostos com outros métodos de preparo de amostras;
- ✓ Aplicar técnica proposta em análise de amostras reais.

4 DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO PROCEDIMENTO ANALÍTICO COMBINANDO MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDA SUPORTADA EM FIBRA OCA E MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA PARA DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS EM SUCO DE SOJA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO DETECTOR DE FLUORESCÊNCIA

Este trabalho teve como objetivo desenvolver, pela primeira vez, uma metodologia de preparo de amostra usando o acoplamento simultâneo de duas técnicas de microextração (HF-LPME e DLLME) para extração de AFLs em amostras de suco de soja utilizando, o mínimo possível de solventes orgânicos e não empregando solventes clorados para extração. Desta forma, foram otimizadas as etapas de preenchimentos dos poros da membrana oca com solvente, sistema de solventes extrator/dispersor, proporção entre os solventes extrator/dispersor, volume adicionado do sistema extrator/dispersor, tempo de extração, efeito da força iônica, tempo e solventes para dessorção dos analitos. Após a otimização da técnica alguns parâmetros analíticos foram determinados, como faixa linear de trabalho, LOD, LOQ, exatidão (recuperação) e precisão intermediária (interdia e intadia).

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Químicos e reagentes

Padrões: Solução padrão estoque de AFLs contendo 1 mg L^{-1} (AFB1 e AFG1) e $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ (AFB2 e AFG2) em metanol foram obtidas da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA). As soluções de trabalho 25 e $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ foram obtidas pela diluição das soluções estoque em metanol. Todas as soluções permaneceram armazenadas a $-8 \text{ } ^\circ\text{C}$ no escuro.

Solventes: Metanol e acetonitrila, ambos grau HPLC (JT Baker, Center Valley, PA U.S.A), foram utilizados como fase móvel e como solventes dispersores para otimização do método. Acetona grau HPLC e n-octanol utilizados como dispersor e para o recobrimento da membrana, respectivamente, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Tolueno, n-hexano, e clorofórmio, utilizados como solventes extratores foram adquiridos da Tedia (Fairfield, OH,

USA). Cloreto de Sódio P.A. Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil), anidrido trifluoroacético (TFAA) foi utilizado como agente derivatizante, tendo sido adquirido da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Água ultra-pura foi obtida a partir da purificação em sistema (Mega Purity, Billerica, USA).

4.1.2 Outros materiais

Frascos de 4 e 2 mL da SUPELCO (Supelco, Bellefonte, PA, USA). *Inserts* de polietileno com capacidade de 150 μL da SUPELCO (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Microseringas de 100 e 250 μL modelos 1701N e 1701RN da marca Hamilton (Reno, Nevada, USA). Membranas de polipropileno (PP) Accurel Q3/2 (600 um d.i., 200 um espessura da parede e 0,2 um de tamanho de poro) adquirida da Membrana (Wuppertal, Alemanha). Também foram utilizados alguns equipamentos como: banho termostatizado (Microquímica, Palhoça, Santa Catarina, Brasil), agitadores magnéticos modelo MQAMA 301 (Microquímica, Palhoça, Santa Catarina, Brasil) e banho de ultrassom ULTRASONIK 28x (Dentsply Ceramco, York, PA, USA)

4.1.3 Instrumentação

Para otimização dos parâmetros da metodologia proposta foi utilizado um HPLC Prominence Shimadzu LC-20AT acoplado ao detector de fluorescência RF-20A Shimadzu (Kyoto, Japão) e injetor manual Rheodyne 7725i (Rohnert Park, CA, USA) com *loop* ou alça de amostragem fixa de 20 μL . As condições de trabalho no LC foram: Coluna de guarda SecurityGuard™ ULTRA C₁₈ (ODS) (2 mm x 4,6 mm d.i., 2 μm) e coluna de separação Phenomenex Kinetex C₁₈ (4,6 mm d.i. x 25 cm x 5 μm d.p.) (Torrance, CA, USA) em fase reversa. As condições cromatográficas utilizadas foram: fase móvel isocrática com vazão de 0,8 mL min⁻¹ composta de água:metanol:acetonitrila (55:30:15, v/v/v), o tempo total de aquisição de dados foi de 15 min. O detector de fluorescência foi ajustado em comprimento de onda de excitação de 360 nm e comprimento de onda de emissão de 440 nm. Os dados cromatográficos foram analisados pelo software LC Solution (Shimadzu, Kyoto, Japan).

4.1.4 Procedimentos

Como afirmado anteriormente, as aflatoxinas são substâncias

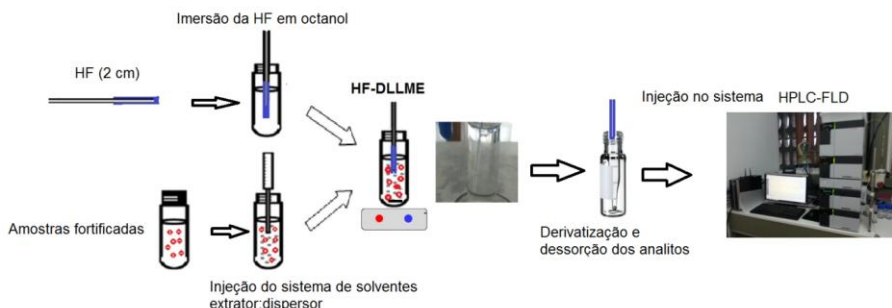
tóxicas com efeitos carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos. Desta forma, todos os procedimentos de manuseio dessas substâncias devem ser realizados com extremo cuidado utilizando os devidos equipamentos de proteção individual e coletiva. Além disso, o material para análise deve ser preparado para que não ocorram perdas dos analitos pela aderência dos mesmos nas vidrarias. Assim, os materiais foram previamente tratados com solução de ácido sulfúrico 2 mol L^{-1} . Com o intuito de evitar resíduos de ácido nos materiais esses devem ser bem enxaguados. As aflatoxinas também possuem instabilidade frente à radiação UV, logo todas as soluções padrões foram estocadas em frascos âmbar e as análises foram realizadas evitando a incidência de luz direta.

4.1.4.1 Preparo das amostras de suco de soja e procedimento de HF-DLLME para determinação de AFLs

Embalagens de 200 mL de suco de soja sabor maçã foram adquiridas nos supermercados da cidade de Florianópolis - Santa Catarina, Brasil. Estas amostras foram estocadas em refrigerador a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de análise. Anteriormente as análises, as embalagens foram agitadas manualmente por cerca de 10 s para homogeneização da amostra.

Um diagrama esquemático do procedimento realizado para extração de AFLs em suco de soja é ilustrado pela **Figura 1**, apresentada a seguir.

Figura 7. Diagrama esquemático do procedimento de extração de aflatoxinas em suco de soja



Fonte: Dados primários (2014).

O procedimento de HF-DLLME para extração de AFLs em suco de soja pode ser resumido em 7 etapas: (1) corte (2cm) e preparo das

membranas cilíndricas e ocas de polipropileno (previamente limpas em acetona grau HPLC e secas) as quais foram fixadas em hastes de aço inoxidável (8 cm de comprimento e 0,5 mm d.i.); (2) alíquotas de 4 mL de suco de soja contendo 2% de NaCl foram fortificadas para realização dos experimentos ($16 \mu\text{g L}^{-1}$ de AFB1 e AFG1 e $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de AFB2 e AFG2); (3) foram adicionados 100 μL da mistura extrator:dispersor (tolueno:acetona), na proporção de 1:5, v/v (DLLME) nas alíquotas fortificadas. (4) Para o procedimento de MMLLE, as membranas fixadas nas hastes foram mergulhadas por 10 s em octanol para o recobrimento e preenchimento dos poros e o excesso de solvente foi retirado com ajuda de papel absorvente; (5) as membranas fixadas e recobertas foram imersas nas alíquotas das amostras e o procedimento de extração propriamente dito foi realizado sob agitação magnética constante pelo período de 60 min. (6) após a extração as membranas foram transferidas para frasco de 2 mL contendo *insert* de 150 μL para o procedimento de derivatização com TFAA:hexano (1:4 v/v) a 65°C por 20 min; (7) finalmente, os analitos derivatizados foram dessorvidos da membrana utilizando 150 μL de acetonitrila:água (50:50 v/v) para injeção no sistema HPLC-FLD .

4.1.4.2 Otimizações

A fim de determinar a melhor condição para extração de AFLs em suco de soja através do método desenvolvido de HF-DLLME, foram realizadas otimizações univariadas e multivariadas.

Inicialmente as otimizações univariadas foram realizadas para determinar as melhores condições de cada técnica utilizadas neste trabalho. Logo foram otimizados:

- 1) **Solvente de extração imobilizado nos poros da membrana:** Para determinar o solvente que mostrou a melhor eficiência de extração das AFLs estudadas, diferentes solventes foram imobilizados na parede porosa das fibras ocas de polipropileno. Os solventes testados foram octanol, hexano, tolueno e dodecanol. Uma membrana sem solvente imobilizado também foi utilizada para fins de comparação. Para este estudo, as amostras aquosas contendo $16 \mu\text{g L}^{-1}$ de AFB1 e AFG1 e $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de AFB2 e AFG2 foram submetidas aos procedimentos de microextração. Uma haste contendo um pedaço de 2 cm de

fibra oca de polipropileno, previamente limpa com acetona grau HPLC e imobilizadas com o solvente a ser estudado, foi imersa na amostra aquosa durante 30 min. Depois disso foi efetuada a derivatização dos analitos de acordo com o procedimento descrito anteriormente.

- 2) **Solventes extrator e dispersor para DLLME:** A segunda otimização univariada realizada foi à determinação da melhor mistura de solventes de extração e dispersão adicionados à amostra antes de colocar a membrana de polipropileno com o solvente imobilizado (octanol). Para este estudo foram testadas diferentes combinações de acordo com a mistura de solventes mais comuns utilizados para procedimentos DLLME para extração destes analitos. Amostras aquosas foram fortificadas com $16 \mu\text{g L}^{-1}$ para AFB1 e AFG1 e $5 \mu\text{g L}^{-1}$ para AFB2 e AFG2. Um volume de $150 \mu\text{L}$ de diferentes misturas de solventes pesquisados foi rapidamente adicionado, com a ajuda de uma microseringa, à amostra aquosa enriquecida. A membrana microporosa contendo octanol imobilizado foi introduzida no sistema para a execução da microextração. A amostra foi mantida sob agitação magnética por um tempo de 30 minutos. Os solventes extratores avaliados foram: hexano, tolueno e clorofórmio, e os solventes dispersores foram: metanol, acetonitrila e acetona.
- 3) **Razão entre os solventes extrator:dispersor:** Após a otimização da combinação de solventes, outra otimização univariada foi realizada para determinar a razão ideal entre esses solventes. As amostras de sucos de maçã foram fortificadas com $16 \mu\text{g L}^{-1}$ de AFB1 e AFG1 e $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de AFB2 e AFG2. Um volume de $150 \mu\text{L}$ de tolueno:acetona com proporções (razões) 1:0, 1:5, 2:5 de solventes extrator:dispersor foi rapidamente adicionado à amostra com a ajuda de uma microseringa. Assim, a membrana microporosa recoberta com octanol foi adicionada ao sistema para executar as microextrações. As amostras foram mantidas sob agitação magnética por 30 minutos para a realização deste passo da otimização.
- 4) **Sistema de solventes para dessorção e tempo de dessorção dos analitos da membrana:** Para a realização destes procedimentos, as amostras aquosas de suco de soja foram fortificadas com $16 \mu\text{g L}^{-1}$ de AFB1 e AFG1 e $5 \mu\text{g}$

L⁻¹ de AFB2 e AFG2, com a ajuda de uma microsseringa foi adicionada rapidamente 150 µL da mistura de tolueno:acetona (1:5, v/v) e então a membrana microporosa suportada em uma haste de aço inoxidável contendo octanol imobilizado foi adicionada ao sistema de microextração. As amostras foram mantidas sob agitação magnética durante 30 minutos. Os solventes para dessorção estudados foram: metanol, água e acetonitrila e uma superfície de resposta triangular foi construída a partir dos dados obtidos quando utilizadas diferentes quantidades de cada solvente para dessorção. A etapa de dessorção foi realizada em um banho de ultrassom, e os tempos de dessorção avaliados foram 5, 10, 15 e 20 minutos. Conseqüentemente, um gráfico de barras foi construído para representar os resultados obtidos para este procedimento.

Outra etapa realizada se refere a otimização multivariada, a qual foi realizada por meio de um planejamento do tipo composto central com o ponto central realizado em triplicata. As variáveis estudadas foram: tempo de extração (25-85 min.), adição de sal (NaCl; 0-10%) e volume total de solvente (15-150 µL) adicionado na amostra aquosa de suco de soja para DLLME. Essas variáveis foram selecionadas a partir de um estudo prévio, no qual foi realizado um diagrama de Pareto para determinação das variáveis significativas. Neste estudo prévio foi verificado que a variável tempo (min.) e a interação entre as variáveis concentração de NaCl (%) e volume total do sistema de solventes extrator:dispersor (µL) eram significativas para este estudo. Desta forma, este novo planejamento do tipo composto central foi realizado com estas três variáveis. Todas as superfícies de resposta foram construídas utilizando o software Statistica 8.0 (Statsoft, USA).

A Tabela 6, apresentada a seguir descreve os experimentos e variáveis estudadas.

Tabela 6. Variáveis, níveis, matriz para o planejamento composto central com ponto central em triplicata na extração de AFLs em suco de soja por HF-DLLME e detecção por HPLC-FLD

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
1 Tempo de extração (min)	24	36	54	72	85
2 NaCl (%)	0	1,5	5	8,5	10
3 Volume total de DLLME (µL)	15	40	80	120	150

Experimento	Tempo	% NaCl	V (uL)
1	36	1,5	40
2	36	8,5	120
3	72	1,5	120
4	72	8,5	40
5	54	5	80
6	36	1,5	120
7	36	8,5	40
8	72	1,5	40
9	72	8,5	120
10	54	5	80
11	24	5	80
12	85	5	80
13	54	0	80
14	54	10	80
15	54	5	15
16	54	5	150
17	54	5	80

Fonte: Dados primários (2014).

4.1.4.3 Procedimento otimizado de extração para análise de AFLs

A extração das AFLs foi realizada a partir de uma alíquota de 4 mL de suco de soja com 2% de NaCl contendo aproximadamente 16 $\mu\text{g L}^{-1}$ de AFB1 e AFG1 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de AFB2 e AFG2. Então, para o procedimento de DLLME foram adicionados 100 μL da mistura extrator:dispersor (tolueno:acetona), na proporção de 1:5, v/v. Para o procedimento de MMLLE, as membranas de polipropileno (PP) foram cortadas em pedaços de 2 cm e previamente limpas em acetona grau HPLC, em banho de ultrassom, por 10 minutos. As membranas então foram fixadas em hastes de aço inoxidável (8 cm de comprimento e 0,5 mm d.i.), e mergulhadas por 10 s em octanol. Após a retirada do excesso do octanol a haste contendo a membrana de PP foi imersa na amostra. A extração foi realizada em sistema fechado, sob agitação magnética constante, por um período de 60 minutos. Após a extração, a membrana suportada na haste foi transferida para um frasco de 2 mL contendo *insert* de 150 μL .

4.1.4.4 Procedimento otimizado de derivatização, dessorção e injeção dos analitos

Ao *insert* contendo a membrana foram adicionados 150 μL de uma mistura de TFAA e hexano (1:4). A solução foi derivatizada por 20 minutos a temperatura de 65 $^{\circ}\text{C}$. Após isto, o extrato foi seco vagarosamente em atmosfera de N_2 . Consecutivamente, a dessorção dos analitos foi realizada em 150 μL de uma mistura de acetonitrila:água (50:50) durante 20 minutos e então 20 μL do extrato foi injetado no HPLC-FD. Para identificação dos analitos foram injetadas soluções padrões de AFLs individuais e misturas, derivatizadas com TFAA para comparar os tempos de retenção obtidos. Além disso, os espectros UV da AFLS foram observados nos comprimentos de onda de absorção máxima e a detecção foi realizada em comprimentos de onda de excitação e emissão seletivos para análise dos mesmos.

4.1.4.5 Curva analítica e figuras de mérito ou parâmetros analíticos

Por meio da técnica de HF-DLLME a curva de calibração analítica foi construída usando suco de soja sabor maçã, fortificado com 5 diferentes concentrações de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2. A faixa de fortificação foi de 0,03-6 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AFB2 e AFG2, e 0,1-21 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AFB1 e AFG1. Através da curva foi estudada a linearidade do método e determinada a faixa linear de trabalho. Os parâmetros analíticos de mérito estudados para validação do método foram: limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), precisão e exatidão.

Os LOD e LOQ foram calculados pela extrapolação da concentração relativa à razão sinal/ruído (S/N) de 3 e 10, respectivamente. A exatidão do método foi verificada através de ensaios de recuperação (%) em três níveis (concentrações) diferentes da curva analítica e todos os experimentos foram realizados em triplicata. O primeiro nível de fortificação foi de 0,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AFG1; 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AFB1; 0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AFG2 e 0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AFB2. O segundo nível de fortificação foi de 4,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AFG1; 4,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AFB1; 1,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AFG2 e 1,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AFB2. O terceiro nível de fortificação foi de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AFG1; 10,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AFB1; 3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AFG2 e 3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AFB2. Os ensaios de precisão intradia (repetibilidade) foram realizados em triplicata na menor concentração da curva analítica. A precisão intermediária (interdia) foi verificada em duas amostras diferentes em diferentes dias também em triplicata.

4.1.4.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram plotados e analisados utilizando ferramentas estatísticas disponíveis nos software Statistica 8 e OriginPro 8.

4.1.5 Comparação da eficiência das técnicas estudadas

Após otimização da metodologia foi estudada a eficiência do método desenvolvido. Essa etapa foi realizada comparando-se o procedimento da técnica proposta com outras técnicas que recentemente foram publicadas na literatura científica internacional. As metodologias comparadas foram: HF-LPME, DLLME e a técnica desenvolvida de HF-DLLME. Todos os procedimentos foram realizados utilizando amostra de suco de soja de maçã contendo 2% de NaCl. As concentrações de aflatoxinas para a fortificação das amostras foram de AFG1 ($10 \mu\text{g L}^{-1}$), AFB1 ($11 \mu\text{g L}^{-1}$), AFG2 ($3 \mu\text{g L}^{-1}$) and AFB2 ($3 \mu\text{g L}^{-1}$).

As condições de extração utilizadas para essas comparações foram:

1) **HF-LPME** (*octanol utilizado como solvente extrator imobilizado nos poros da parede da membrana oca*): 2 cm membrana de polipropileno foi fixada em uma haste de aço inoxidável (8 cm de comprimento e 0,5 mm de i.d.) e imersa por 10 s em octanol, em seguida o excesso de solvente foi removido com auxílio de papel absorvente. A haste com a membrana foi então imersa completamente no frasco contendo a amostra de suco fortificada, por um período de 60 minutos. Em seguida, foi realizada a derivatização utilizando 150 μL de TFAA:hexano (1:4) a 65 °C durante 20 min; o solvente então foi evaporado em atmosfera inerte de N_2 e reconstituída em acetonitrila:água (50:50 v/v) com auxílio de banho ultrassônico. Por fim, uma alíquota de 20 μL foi injetada no sistema de HPLC-FD.

2) **DLLME**: A técnica proposta de HF-DLLME foi comparada com uma técnica já publicada de DLLME (AFZALI *et al.*, 2012). Para a realização do procedimento de DLLME foram utilizadas as condições ótimas encontradas pelos autores, apenas pequenas modificações foram realizadas com o objetivo de permitir uma melhor comparação com o método proposto por AFZALI *et al.* (2012). A amostra não passou por nenhum outro procedimento de preparo de amostra anterior a aplicação da técnica de microextração, para que dessa forma, o método a ser comparado se tornasse o mais semelhante à técnica desenvolvida.

Portanto, foram utilizados 5 mL de suco de soja em pH 7,4 contendo 500 µL de acetonitrila (solvente dispersor) e 0,5 mL de solução de NaNO₃ (10%). A amostra foi fortificada com AFG1 (10 µg L⁻¹), AFB1 (11 µg L⁻¹), AFG2 (3 µg L⁻¹) e AFB2 (3 µg L⁻¹). Então, foram adicionados rapidamente 120 µL de clorofórmio (solvente extrator) à amostra. A solução foi então centrifugada a 4000 rpm por 3 minutos. A fase sedimentada foi coletada com auxílio de uma microsseringa e transferida para frasco para evaporação do clorofórmio. O extrato seco foi derivatizado conforme descrito na seção 4.1.4.4. O extrato derivatizado foi então diluído com 150 µL de uma mistura de acetonitrila:água (50:50) e finalmente 20 µL do extrato foi injetado no sistema de HPLC-FLD.

3) **HF-DLLME**: A eficiência da extração do método proposto foi verificado através da realização dos procedimentos descritos nas seções 4.1.4.3 e 4.1.4.4.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

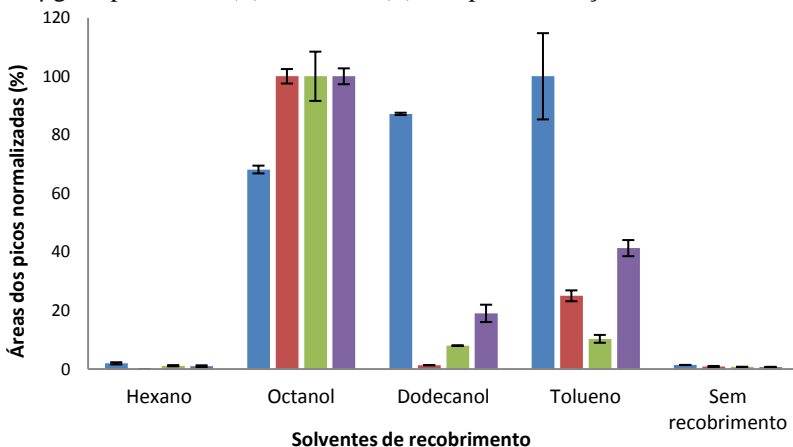
4.2.1 Otimização do solvente de recobrimento para os poros da parede da membrana

Anteriormente à otimização do solvente de recobrimento da membrana foi realizado um estudo inicial, onde foram combinadas as técnicas de DLLME e HF-LPME. Neste estudo, foi adicionada uma mistura contendo alguns microlitros de solventes de extração e dispersores para as amostras. Os resultados mostraram uma melhora significativa nas respostas cromatográficas quando comparado com a técnica de HF-LPME tradicional com a membrana porosa. Esta mistura de solvente foi estudada após otimização do solvente utilizado para o recobrimento da parede porosa da fibra oca.

Cabe ressaltar que os solventes testados foram selecionados devido as suas características físico-químicas, potencial extrativo para AFLs, além de estarem disponíveis no laboratório.

A **Figura 8** mostra a eficiência da extração dos diferentes solventes de recobrimento avaliados, sendo que todas as análises foram realizadas em triplicata e as áreas dos picos cromatográficos normalizadas foram utilizadas para fins comparativos.

Figura 8. Otimização do solvente de recobrimento utilizado para imobilização dos poros da fibra oca da técnica de HF-DLLME. Condições de extração: amostra aquosa contendo $16 \mu\text{g L}^{-1}$ para AFB1 (■) e AFG1(■) e $5 \mu\text{g L}^{-1}$ para AFB2(■) and AFG2(■), tempo de extração 30 min.



Fonte: Dados primários (2014).

De acordo com a **Figura 8**, o octanol mostrou a melhor eficiência de extração para as 4 aflatoxinas estudadas, sendo que o tolueno apresentou apenas eficiência superior para extração da toxina AFG1. Conforme Campone *et al.* (2011), o octanol tem-se mostrado um solvente de extração quase ideal, devido às suas características, tais como: sua baixa solubilidade em água, baixa pressão de vapor, cadeia longa de hidrocarboneto a qual pode facilmente acomodar moléculas de analitos de baixa polaridade, e a presença de um grupo hidroxila o qual pode ser importante para a estabilização de quaisquer grupos funcionais polares na molécula (CAMPONE *et al.*, 2011). Portanto, o octanol foi escolhido como solvente para recobrimento/imobilização dos poros da parede da fibra oca.

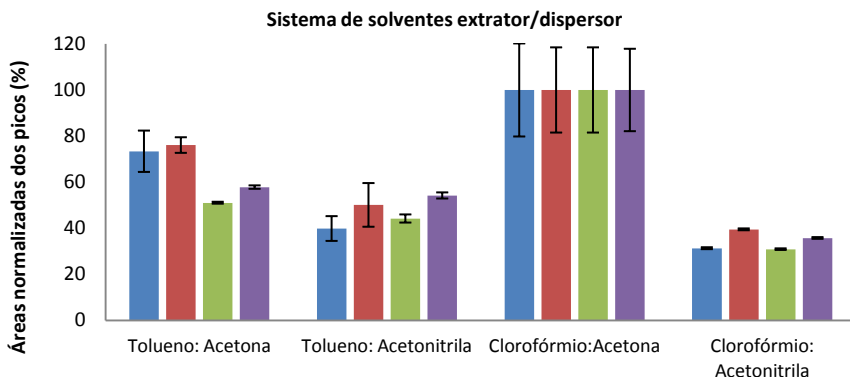
4.2.2 Otimização da mistura de solvente extrator e dispersor adicionado às amostras aquosas

Nessa etapa de otimização, 9 pares misturas de solventes extrator:dispersor foram testadas. As misturas também foram selecionadas conforme o potencial de extração para AFLs e disponibilidade laboratorial. Cabe ressaltar, que embora o objetivo desse trabalho fosse a não utilização de solventes clorados, misturas com

clorofórmio foram testadas, pois em todos os trabalhos revisados para extração de AFLs esse solvente foi testado apresentando, na maioria das vezes, o melhor desempenho.

A **Figura 9** mostram os resultados obtidos para os sistemas de solventes estudados, exceto os pares que utilizavam hexano como extrator e metanol como dispersor, pois esses pares mostraram eficiência muito inferior se comparado aos pares apresentados na figura a seguir.

Figura 9. Otimização do sistema de solventes extrator/dispersor. Condições de extração: amostra aquosa contendo $16 \mu\text{g L}^{-1}$ para AFB1 (■) e AFG1(■) e $5 \mu\text{g L}^{-1}$ para AFB2(■) e AFG2(■), tempo de extração 30 min., volume total de $150 \mu\text{L}$ de mistura extrator/dispersor, octanol imobilizado nos poros da parede da fibra oca de polipropileno



Fonte: Dados primários (2014).

De acordo com a **Figura 9**, a melhor mistura de solventes extrator/dispersor para extração de aflatoxinas em amostras aquosas, adicionados anteriormente à introdução de membranas porosas foi composta de clorofórmio e acetona. No entanto, como o objetivo do presente trabalho era a não utilização de solvente clorado, foi preferida a utilização da mistura de tolueno e acetona. Além disso, os resultados da mistura composta de tolueno e acetona mostraram estimativas de desvios padrão relativos mais baixos do que os observados para a mistura de clorofórmio e acetona.

É importante ressaltar, que todas as metodologias já encontradas para extração de AFLs utilizam solventes clorados, os quais são mais tóxicos para laboratoristas e para o meio ambiente. Além disso, o tratamento dos resíduos desses solventes são geralmente mais difíceis e

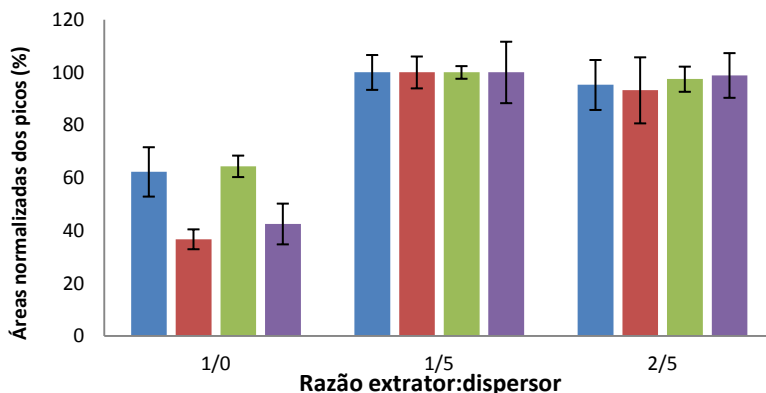
caros (CAMPONE *et al.*, 2011; AFZALI *et al.*, 2012; LAI *et al.*, 2014a).

4.2.3 Otimização da razão entre os solventes extrator e dispersor

Outro ponto importante a ser considerado nos procedimentos de DLLME é a razão entre os solventes extrator:dispersor. Assim, após a otimização da combinação de solventes, outra otimização univariada foi realizada para determinar a razão ideal entre esses solventes.

A **Figura 10** mostra o gráfico de barras com as áreas normalizadas de cada pico cromatográfico das respectivas AFLs, para diferentes proporções do sistema de solventes tolueno:acetona.

Figura 10. Otimização da proporção entre solvente extrator:dispersor. Condições de extração: amostra aquosa contendo $16 \mu\text{g L}^{-1}$ para AFB1 (■) e AFG1(■) e $5 \mu\text{g L}^{-1}$ para AFB2(■) e AFG2(■), tempo de extração 30 min., volume total de $150 \mu\text{L}$ de mistura tolueno/acetona, octanol imobilizado nos poros da parede da fibra oca de polipropileno



Fonte: Dados primários (2014).

Como mostrado na **Figura 10**, a adição de solventes dispersores aumenta substancialmente a eficiência da extração de todos os analitos. Esta adição permite a formação de uma grande área de superfície entre a amostra aquosa e o sistema de extração constituído por solvente de extrator/dispersor. Este fato pode ser explicado comparando os resultados obtidos com e sem o uso de um dispersor de solvente.

Ainda baseado nos dados apresentados na **Figura 4**, observa-se que entre as proporções 1:5 e 2:5 não houve diferença significativa nos resultados obtidos para todos os compostos avaliados, considerando os

desvios encontrados. Assim, a proporção de 1:5 foi escolhida como a condição otimizada desta etapa, uma vez que, desta forma, se utilizam menores quantidades de tolueno, o qual também é um solvente tóxico.

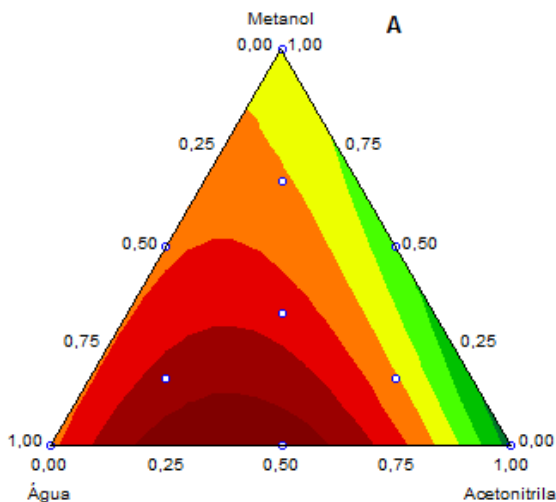
4.2.4 Otimização do tempo e sistema de solventes para dessorção dos analitos

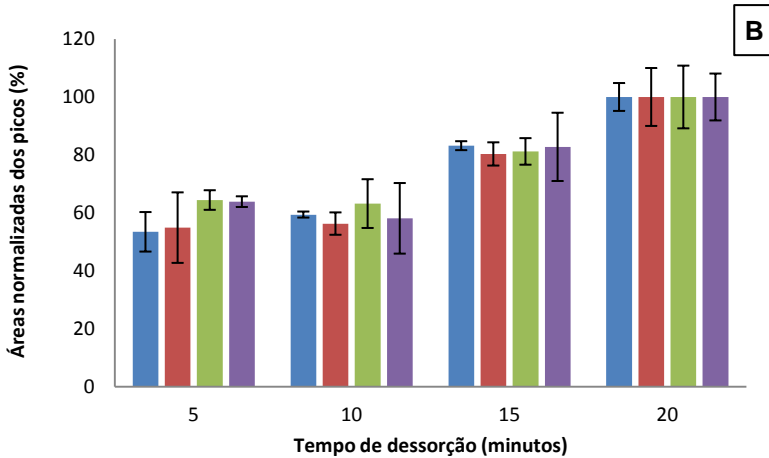
Para completar as otimizações univariadas foram determinadas as condições ideais para dessorção dos analitos do sistema de extração. Portanto, foram otimizadas as condições de tempo de dessorção e sistema de solventes para a dessorção no processo HF-DLLME.

Os solventes para dessorção estudados foram: metanol, água e acetonitrila, e uma superfície de resposta triangular foi construída a partir dos dados obtidos quando utilizadas diferentes quantidades de cada solvente para dessorção (**Figura 11A**).

A etapa de dessorção foi realizada em banho de ultrassom e os tempos de dessorção avaliados foram 5, 10, 15 e 20 minutos. Após isto, um gráfico de barras foi construído para representar os resultados obtidos para este procedimento. Esses dados podem ser vistos na **Figura 11B**.

Figura 11. Otimização do sistema de solventes e tempo para dessorção das Aflatoxinas em suco de soja. Superfície triangular (A) obtido para o sistema de solventes de dessorção e gráfico de barras(B) para tempo de dessorção.





Condições de extração: amostra de suco contendo $16 \mu\text{g L}^{-1}$ para AFB1 (■) e AFG1(■) e $5 \mu\text{g L}^{-1}$ para AFB2(■) e AFG2(■), tempo de extração 30 min., volume total de $150 \mu\text{L}$ de mistura tolueno/acetona, octanol imobilizado nos poros da parede da fibra oca de polipropileno
 Fonte: Dados primários (2014).

De acordo com de superfície triangular mostrada na **Figura 11A**, pode-se perceber que tanto um sistema ternário água:acetona:metanol, (20:60:20 ou 33:33:33) como binário água:acetona (50:50) podem ser utilizados sem diferença significativa para a dessorção dos analitos. Assim, optou-se pela utilização da mistura binária de solventes composta por acetona e água na razão 50:50 (v/v) pela facilidade de preparo.

Quanto ao tempo de dessorção (**Fig. 11B**) a melhor resposta foi obtida com 20 minutos e esta foi selecionada como condição ótima.

4.2.5 Otimização multivariada

Na última etapa de otimização realizada neste estudo, a condição de extração ideal no que diz respeito ao tempo de extração, adição de sal e o volume total de solventes adicionados na amostra de suco de soja foi determinada. Para isso, foi desenvolvido um planejamento multivariado do tipo composto central, com ponto central em triplicata. A **Tabela 7** apresenta a média geométrica obtida para as AFLs em cada condição do delineamento experimental, essa resposta foi utilizada para a construção das superfícies.

Tabela 7. Planejamento composto central e respostas obtidas para o procedimento de HF-DLLME para determinação de AFLs em sucos de soja

Experimento	Tempo	% NaCl	V (uL)	Resposta				Compromisso
				AFG1	AFB1	AFG2	AFB2	
1	36	1,5	40	9587	91917	17043	124266	36961
2	36	8,5	120	129108	993475	80375	448396	260749
3	72	1,5	120	228130	2040850	114771	657764	432986
4	72	8,5	40	1410	11651	6184	3077	4205
5	54	5	80	249999	2739807	117041	699600	486644
6	36	1,5	120	101111	1036130	51439	286251	198181
7	36	8,5	40	97945	1262572	51328	319052	212136
8	72	1,5	40	60452	547148	111302	668793	222755
9	72	8,5	120	52491	478122	36644	216082	118730
10	54	5	80	249885	2689796	107609	629753	461976
11	24	5	80	38725	318199	47070	270874	111957
12	85	5	80	92554	906180	73059	439303	227778
13	54	0	80	214179	2070076	148880	926014	497227
14	54	10	80	67241	523161	46725	254522	143016
15	54	5	15	93533	1038761	37522	193996	163076
16	54	5	150	72795	520415	120372	667881	234919
17	54	5	80	250113	2789817	126473	769447	510472

Fonte: Dados primários (2014)

A **Tabela 8** e a **Figura 12** apresentadas a seguir, mostram a análise de variância (ANOVA) e as superfícies de resposta construídas a partir dos resultados dos experimentos.

Tabela 8. Resultados obtidos por meio da análise de variância simples (ANOVA - *one way*) das variáveis significativas para o procedimento de HF-DLLME na determinação de AFLs em suco de soja

Fatores	SS	df	MS	F	p
(1) Tempo de extração (min.)	1,50E+11	1	1,50E+11	36,69	0,0010
(2) Adição de sal (% m/v)	5,31E+10	1	5,31E+10	12,963	0,0090
(3) Volume sistema extrator:dispersor (uL)	1,30E+11	1	1,30E+11	31,739	0,0010
1 by 2	7,42E+10	1	7,42E+10	18,113	0,0040
1 by 3	1,65E+09	1	1,65E+09	0,403	0,5460
2 by 3	5,42E+09	1	5,42E+09	1,324	0,2880
Error	2,87E+10	7	4,10E+09		
Total SS	4,30E+11	16			

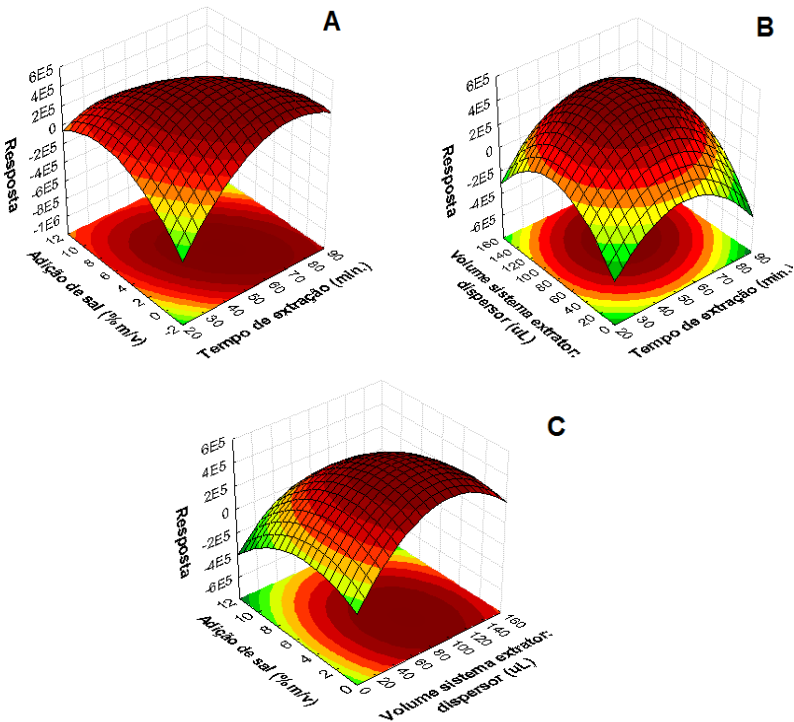
Fonte: Dados primários (2014).

A partir da análise de variância foi possível verificar que as variáveis tempo de extração (1), adição de sal (2) e volume total do sistema de solventes extrator:dispersor (3) foram estatisticamente

significativos ($p < 0,05$), ou seja, exercem efeito significativo sobre a extração das aflatoxinas em suco de soja quando utilizada a técnica de preparo de amostra HF-DLLME. Além disso, a interação entre as variáveis (1) e (2) também foi significativa.

Também através da análise de variância foi possível observar que os valores de F foram estatisticamente significativo para estas variáveis, o que permite concluir que existe uma maior dispersão de valores entre os fatores estudados em relação resultados dentro da mesma variável.

Figura 12. Superfícies de resposta obtidas para a condição compromisso das AFLs a partir do planejamento composto central para otimização das variáveis, tempo de extração, adição de NaCl, e volume do sistema de solvente extrator/dispersor. **(6A)** Variáveis tempo *versus* adição de NaCl; **(6B)** Variáveis tempo *versus* volume de solvente extrator/dispersor; **(6C)** Variáveis volume de solvente extrator/dispersor *versus* adição de NaCl;



*Condições de extração: amostra aquosa contendo $16 \mu\text{g L}^{-1}$ para AFB1 e AFG1 e $5 \mu\text{g L}^{-1}$ para AFB2 e AFG2, sistema de solventes utilizados tolueno/acetona (1:5), octanol imobilizado nos poros da parede da fibra oca de polipropileno

Fonte: Dados primários (2014).

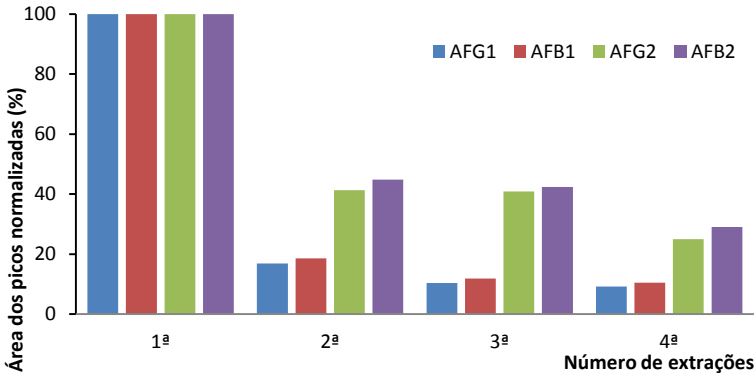
De acordo com os resultados obtidos e a partir da construção das superfícies de resposta foi possível estabelecer as condições otimizadas para a extração das aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 utilizando a técnica de HF-DLLME. O coeficiente de correlação entre as variáveis estudadas pelo planejamento de composto central foi de 0,93327 para condição compromisso para as aflatoxinas.

Com relação ao tempo de extração foi observado que 60 minutos foram suficientes para alcançar grande eficiência de extração. Quanto à adição de sal (NaCl) observou-se que existe um pequeno efeito negativo na adição desse na extração das toxinas AFB2 e AFG2, enquanto que um pequeno efeito positivo para extração de AFB1 e AFG1. Desta forma, definiu-se que a quantidade de 2% de NaCl adicionado na amostra de suco de soja, acarreta boas respostas na condição compromisso para os quatro analitos. Portanto, esta então foi a condição de extração ideal para essa variável. Outra variável estudada foi o volume total de sistema de solventes extrator/dispersor adicionado na amostra aquosa, cuja melhor eficiência de extração foi obtida em uma faixa de volume que variou entre 60-120 μL , uma vez que para AFB1 essa faixa ficou mais abaixo, optou-se pela utilização de 100 μL da mistura de tolueno:acetona como sistema extrator:dispersor.

De acordo com Campone *et al.* (2011), a adição de sal não é uma variável significativa em se tratando da técnica de microextração de DLLME para AFLs, enquanto que o volume de solvente extrator é significativo sendo que quanto maior volume de solvente extrator maior a eficiência de extração. Para os autores supracitados, o aumento da proporção de solvente dispersor influencia negativamente a extração dessas micotoxinas.

Com o objetivo de verificar se a técnica de HF-DLLME era exaustiva ou não exaustiva para a extração das 4 AFLs em sucos de soja foram realizados experimentos, os quais foram baseados em 4 extrações sequenciais de uma mesma amostra de suco de soja fortificada com AFLs. O procedimento foi realizado nas condições ótimas obtidas no presente estudo. A **Figura 13** apresenta os dados obtidos para esses experimentos.

Figura 13. Teste de exaustividade da técnica de HF-DLLME para determinação de AFLs em suco de soja.



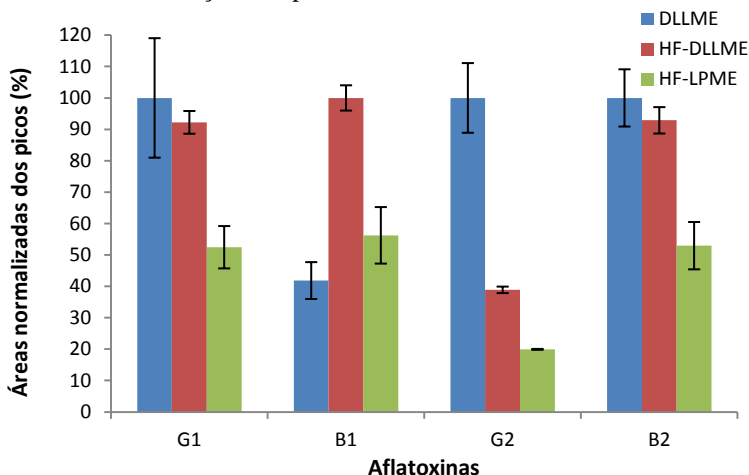
Condições de extração: amostra de suco contendo $16 \mu\text{g L}^{-1}$ para AFB1 (■) e AFG1(■) e $5 \mu\text{g L}^{-1}$ para AFB2(■) e AFG2(■), tempo de extração 60 min., volume total de 100 μL de mistura tolueno/acetona, octanol imobilizado nos poros da parede da fibra oca de polipropileno
 Fonte: Dados primários (2014).

Conforme os dados obtidos, observou-se que mesmo após a quarta extração realizada na mesma amostra de suco de soja, concentrações dos analitos ainda estavam presentes e variavam entre 10-30% do total extraído no primeiro procedimento. Desta forma, também foi possível concluir que a técnica desenvolvida não é exaustiva, uma vez que, as condições ótimas de extração foram determinadas em condições de equilíbrio. Portanto, verificou-se que a técnica de HF-DLLME possui características predominantes que se assemelham a técnica de HF-LPME em duas fases.

4.2.6 Comparação entre a eficiência de extração da técnica de HF-DLLME com outras técnicas

Após todos os passos de otimização, as técnicas de preparo de amostra de HF-LPME, DLLME e HF-DLLME foram comparados para verificar a eficiência da extração de cada método para a extração das 4 aflatoxinas objeto de estudo em suco de soja. Os resultados obtidos para cada procedimento de microextração são apresentados pelo gráfico de barras contido na **Figura 14**. Neste gráfico, foram apresentadas as respostas obtidas pelas médias aritméticas normalizadas dos picos cromatográficos dos quatro analitos, para cada extração.

Figura 14. Eficiência de extração de AFLs em suco de soja para cada técnica de microextração comparada neste trabalho



Fonte: Dados primários (2014).

Como pode ser observada a partir da Figura 14, a nova proposta de microextração por HF-DLLME apresentou melhor eficiência em comparação com a técnica de HF-LPME para todos os compostos estudados. Ao comparar o método de DLLME à técnica proposta, pode-se perceber que a técnica de DLLME apresenta melhor eficiência de extração para a toxina AFG2. Enquanto que a nova abordagem de HF-DLLME apresenta semelhante eficiência para extração de AFG1 e AFB2, no entanto o método de DLLME mostrou desvios padrão relativo maiores. É importante enfatizar que a técnica proposta apresentou melhor eficiência de extração para AFB1, micotoxina essa que possui maior potencial tóxico, logo maior risco para saúde humana (AFZALI *et al.*, 2012).

Estes resultados obtidos a partir da técnica de HF-DLLME foram muito interessantes, principalmente se comparado as quantidades de solventes orgânicos utilizados nesta proposta. Enquanto que para DLLME foram usados 620 μL de mistura contendo de clorofórmio:metanol, para o processo HF-DLLME foram utilizados apenas 100 μL de tolueno:acetona como sistema de solventes extrator:dispensor. Além disso, é muito importante ressaltar que, para o processo HF-DLLME a utilização de solventes clorados, tais como o clorofórmio, não foi necessária, obtendo-se, mesmo assim, eficiências

semelhantes. Além disso, como consequência do não uso de solventes clorados, o processo HF-DLLME não requer centrifugação para a coleta do solvente de extração, evitando assim um passo crítico.

Portanto, todas as características mencionadas anteriormente tornam este novo procedimento de HF-DLLME muito atraente, pois permitiu bom desempenho nas extrações associado ao baixo consumo de solventes orgânicos tóxicos, principalmente referindo-se às crescentes preocupações ambientais e à segurança do trabalho em química analítica.

Uma segunda etapa de comparação foi realizada entre os resultados deste estudo e os dados encontrados na literatura, referentes aos principais métodos de extração e limpeza utilizados para análise de aflatoxinas em amostras complexas (**Tabela 9**).

Verificou-se que a técnica de HPLC-FD é amplamente utilizada para a detecção de AFLs, embora ela exija uma etapa adicional de derivatização. Quanto aos métodos de derivatização, os que utilizam pós-coluna são os preferidos, uma vez que não é necessária a manipulação dos extratos. No entanto, a derivatização pré-coluna utilizando TFA como reagente ainda é empregada. Nota-se que outros instrumentos mais sofisticados, os quais permitem a identificação e quantificação em níveis mais baixos, também foram usados, incluindo LC-MS/MS e UHPLC-Q-TOF-MS/MS. Atualmente, os detectores MS são preferíveis, porque eles não só melhoram a detectabilidade e seletividade do método, mas também porque o passo de derivatização não é necessário. De acordo com Quinto *et al.* (2009), a técnica instrumental de HPLC é mais acessível, porque o equipamento está disponível na maioria dos laboratórios analíticos de rotina. Logo, de acordo com os autores supracitados, essa prática permanece aceitável e é favorecida, apesar da tendência atual de utilização de LC-MS/MS (QUINTO *et al.*, 2009).

Em se tratando da instrumentação por LC-MS/MS, embora ela apresente vantagens analíticas inegáveis, é necessário ressaltar que esse tipo instrumento requer uma estrutura física complexa, além de apresentar um custo muito maior para laboratórios que realizam análises de rotina de AFLs, se comparado com a instrumentação de HPLC-FLD. Como este estudo foi desenvolvido utilizando a instrumentação de HPLC-FD e derivatização com TFAA foi necessária e todos os cuidados para alcançar a melhor eficiência foram tomados.

Cabe ressaltar, que com uso de uma instrumentação mais sofisticada seria possível melhorar ainda mais os resultados obtidos. Além disso, observou-se que o presente estudo apresenta tempo de

análise compatível ou até mesmo mais rápido (cerca de 100 min) em comparação com outros métodos, porque este método proposto permite a realização de múltiplas extrações ao mesmo tempo.

A técnica de HF-DLLME também provou ser mais barata em comparação com métodos alternativos, como cartuchos de SPE e IAC, porque as quantidades de membrana e solventes utilizados são pequenas.

Quanto aos limites de quantificação da técnica proposta, observou-se que os valores foram similares ou melhores do que os apresentados pelos outros métodos incluídos na **Tabela 9**. Porém, é essencial destacar que muitos dos métodos encontrados na literatura são aplicados em matrizes sólidas, portanto diferentes da matriz estudada no presente trabalho. Apenas uma pesquisa também utilizou produtos derivados de soja como matriz, porém os autores não apresentaram os valores de LOQ para a mesma (BELTRÁN *et al.*, 2013).

Tabela 9. Comparação entre métodos utilizados para extração/limpeza de aflatoxinas em matrizes complexas. (Continua)

Extração/Limpeza	Derivatização	Instrumental	Matriz	Analitos	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
HF-DLLME	Pré-coluna TFA 65°C/9 min	HPLC-FD	Suco de soja	AFB1	0,1	Este estudo
				AFB2	0,1	
				AFG1	0,03	
				AFG2	0,03	
SLE- QuEChERS- DLLME	NN ^d	UHPLC-MS/MS	Nozes e sementes	AFB1	0,71	(ARROYO- MANZANARES <i>et al.</i> , 2013)
				AFB2	0,97	
				AFG1	0,61	
				AFG2	0,95	
LLE-IAC-DLLME	Pós-coluna	HPLC-FD	Óleos comestíveis	AFB1	0,0008 ^c	(AFZALI <i>et al.</i> , 2012)
				AFB2	0,005	
				AFG1	0,0001	
				AFG2	0,003	
SLE-DLLME	Pós-coluna fotoquímica	HPLC-FD	Cereais	AFB1	0,12	(CAMPONE <i>et al.</i> , 2011)
				AFB2	0,10	
				AFG1	0,57	
				AFG2	0,33	
LLE-DLLME	Pré-coluna TFA 40°C/15 min.	HPLC-FD	Arroz	AFB1	0,03	(LAI <i>et al.</i> , 2014b)
				AFB2	0,02	
SLE-QuEChERS- DLLME	NN	UHPLC-MS/MS	Sementes e extratos de ervas	AFB1	1,87	(ARROYO- MANZANARES; GARCÍA-CAMPAÑA; GÁMIZ-GRACIA, 2013)
				AFB2	1,91	
				AFG1	1,50	
				AFG2	1,79	
IAC	Pós-coluna fotoquímica (PHRED)	HPLC-FD	Ar de aviários	AFB1	NI ^d	(WANG <i>et al.</i> , 2008)
				AFB2		
				AFG1		
LLE-IAC	Pós-coluna eletroquímica (Kobra cell)	HPLC-FD	Temperos	AFB1	0,16	(OZBEY; KABAK, 2012)
				AFB2	0,14	

(continuação)

				AFG1	0,18	
				AFG2	0,14	
				AFB1	0,01	
SLE-SPE	NN ^d	UHPLC-MS/MS	Alimentos e rações	AFB2	0,01	(REN <i>et al.</i> , 2007)
				AFG1	0,01	
				AFG2	0,02	
				AFB1	0,1	
SLE-IAC	Pós-coluna fotoquímica (UVE)	HPLC-FD	Alimentos sem glúten	AFB2	0,025	(CANO-SANCHO <i>et al.</i> , 2012)
				AFG1	0,1	
				AFG2	0,025	
				AFB1	0,08	
SLE-IAC	Pós-coluna eletroquímica (Kobra cell)	HPLC-FD	Pigmento de arroz	AFB2	0,05	(ZHU <i>et al.</i> , 2013)
				AFG1	0,15	
				AFG2	0,15	
				AFB1	0,40 ^e	
SLE or LLE	NN	UHPLC-(ESI) MS/MS	Cereais, frutas, sucos, pães, derivados lácteos, produtos de soja e óleos	AFB2	0,30	(BELTRÁN <i>et al.</i> , 2013)
				AFG1	0,40	
				AFG2	0,14	
				AFB1	0,21	
SLE-SPME	Pós-coluna fotoquímica	HPLC-FD	Cereais em farinha	AFB2	0,10	(QUINTO <i>et al.</i> , 2009)
				AFG1	0,63	
				AFG2	0,18	
				AFB1	0,39	
SLE	NN ^d	HPLC-ESI-QTOF-MS/MS	Cevada, trigo, soja, milho, amendoim e manteiga de amendoim	AFB2	0,47	(SIRHAN; TAN; WONG, 2013)
				AFG1	0,59	
				AFG2	0,70	
				AFB1	0,03	
SLE-IAC	Pré-coluna TFA 40°C/15 min.	HPLC-FD	Temperos	AFB2	0,03	(CHO <i>et al.</i> , 2008)
				AFG1	0,45	
				AFG2	0,06	
				AFB1	0,02	
LLE-LTP	Pós-coluna fotoquímica (PHRED)	HPLC-FD e HPLC-MS/MS	Leite materno	AFB2	0,005	(ANDRADE; GOMES DA SILVA; CALDAS, 2013)
				AFG1	0,03	

(conclusão)

SLE-IAC	Pós-coluna fotoquímica (PHRED)	HPLC-FD	Temperos e mistura de temperos	AFG2	0,01	(WAN AINIZA; JINAP; SANNY, 2015)
				AFB1	0,4	
				AFB2	0,2	
				AFG1	0,4	
				AFG2	0,2	
SLE-IAC	NN ^d	HPLC-ESI-MS/MS	Temperos	AFB1	0,28-0,83 ^a	(PRELLE <i>et al.</i> , 2014)
				AFB2		
				AFG1		
				AFG2	0,41-2,20 ^b	
				AFB1	0,20 ^c	
SLE-IAC	Pré-coluna TFA/ 30s	HPLC-FD	Pólen de abelha espanhola	AFB2	0,13	(GARCIA-VILLANOVA <i>et al.</i> , 2004)
				AFG1	0,10	
				AFG2	0,13	
				AFB1	0,17	
				AFB2	0,04	
SLE-IAC	Pós-coluna fotoquímica (UVE)	HPLC-FD e HPLC-MS/MS	Nozes e produtos de amendoim amêndoa e semente de damasco	AFG1	0,22	(IMPERATO <i>et al.</i> , 2011)
				AFG2	0,04	
				AFB1	0,20	
				AFB2	0,20	
				AFG1	0,20	
SLE-IAC	Pós-coluna PBPB	HPLC-FD	Produtos de milho e manteiga de amendoim	AFG2	0,20	(CHAN <i>et al.</i> , 2004)
				AFB1		
				AFB2		
				AFG1		
				AFG2		
SLE-IAC	Pré-coluna TFA 65°C/9 min Pós-coluna fotoquímica (PHRED) e Electroquímica (Kobra cell)	HPLC-FD e HPLC/MS	Raízes	AFB1		(TRUCKSESS <i>et al.</i> , 2006)
				AFB2	NI	
				AFG1		
				AFG2		
				AFB1	1,7	
SLE or LLE-IAC	Pré-coluna TFA	HPLC-FD	Ração	AFB2	1,7	(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2008)
				AFG1	1,7	
				AFG2	1,7	
				AFB1		
				AFB1	NI ^d	
IMBs	NN ^d	HPLC-MS e ELISA	Molho de soja	AFB1	NI ^d	(XIE <i>et al.</i> , 2014)

SLE: extração sólido-líquido; LLE: extração líquido-líquido; IAC: coluna de imunoafinidade; SPE: extração em fase sólida; SPME: microextração em fase sólida; LTP: purificação em baixa temperatura; QuEChERS: rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro; DLLME: microextração líquido-líquido dispersiva; IMBs: esferas imunomagnéticas; a: valores para AFB1 b: valores para soma total de AFLs c: valores de LOD d: NN não necessário or NI não informado; e: valores de LOQs para produtos de soja

4.2.7 Parâmetros analíticos

Após a otimização dos fatores que afetam a técnica de HF-DLLME, as melhores condições obtidas relativas ao processo HF-DLLME foram utilizadas para a determinação dos parâmetros analíticos para a extração de AFLs em amostras de suco de soja com sabor de maçã. A curva analítica foi construída com cinco pontos através do método de adição dos padrões de AFLs em amostras de suco. As equações da reta, a faixa linear de trabalho, o coeficiente de correlação linear (R^2), os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) estão apresentados na **Tabela 10**. Cabe ressaltar que todas as análises para esses parâmetros foram realizadas em triplicata.

Tabela 10. Alguns parâmetros analíticos obtidos para técnica de HF-DLLME em amostras de suco de soja.

Analito	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação da reta	R^2	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
B1	0,1-21	$y = 130182x - 18552$	0,9944	0,06	0,20
G1	0,1-21	$y = 9324,9x - 354,54$	0,9940	0,27	0,90
B2	0,03-6	$y = 197637x + 23484$	0,9995	0,03	0,1
G2	0,03-6	$y = 37114x + 5783,9$	0,9992	0,14	0,43

Fonte: Dados primários (2014).

De acordo com a **Tabela 10**, o processo HF-DLLME apresentou boa linearidade para todos os compostos na faixa de trabalho estudada.

Quanto aos valores de LOD e LOQ, verificou-se que os valores encontrados atendem os limites estipulados pelas agências de segurança da União Europeia (UE) e Brasil. Uma vez que a UE estipula um LMR de $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ para AFB1 e o somatório das 4 AFLs (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2), respectivamente, para cereais e todos os produtos derivados de cereais destinados para o consumo humano (EC, 2010). No Brasil, legislação, regulamenta LMR de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFLs para cereais e todos os produtos derivados de cereais, porém não especifica o LMR para leguminosas e seus derivados, somente menciona que devem ser aplicados também estes produtos (BRASIL, 2011).

Embora ainda não existam LMR específicos para o tipo de matriz utilizada neste estudo, os LOD e LOQ encontrados estão de acordo com os limites mencionados anteriormente.

Além disso, testes de recuperação e de precisão (precisão intradia

e interdia) foram realizados para o procedimento de HF-DLLME proposto em amostras de suco de soja utilizando três níveis de concentrações. Os resultados obtidos são apresentados na **Tabela 11**.

Tabela 11. Recuperação em três níveis da curva analítica, precisão intradia (repetibilidade) e precisão intermediária (interdia) para o primeiro nível.

Analito	Recuperação (%)			Precisão RSD (%)	
	1º nível ¹	2º nível ²	3º nível ³	Intradia	Interdia
B1	97	112	112	16	17
G1	104	97	117	18	14
B2	83	84	72	14	12
G2	95	97	88	16	15

¹ Primeiro nível: 0,9 µg L⁻¹ para AFG1; 1,0 µg L⁻¹ para AFB1; 0,3 µg L⁻¹ para AFG2 e 0,3 µg L⁻¹ para AFB2.

² Segundo nível: 4,4 µg L⁻¹ para AFG1; 4,7 µg L⁻¹ para AFB1; 1,3 µg L⁻¹ para AFG2 e 1,3 µg L⁻¹ para AFB2.

³ Terceiro nível: 10 µg L⁻¹ para AFG1; 10,7 µg L⁻¹ para AFB1; 3,0 µg L⁻¹ para AFG2 e 3,0 µg L⁻¹ para AFB2.

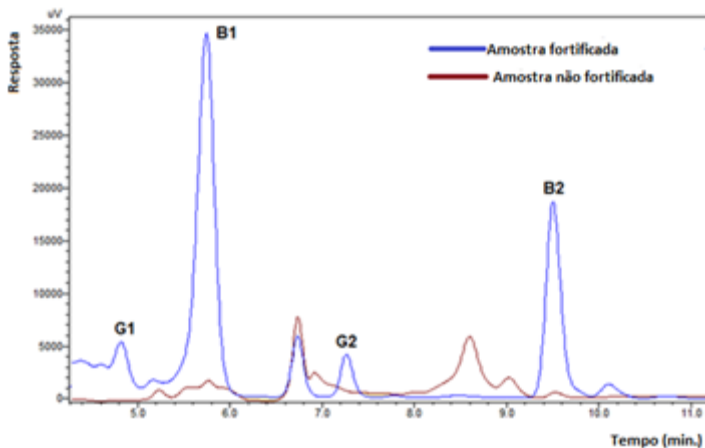
Fonte: Dados primários (2014).

De acordo com o regulamento da UE n.401/2006 o qual estabelece os critérios de desempenho dos métodos de análise e controle de micotoxinas em alimentos, as recuperações aceitáveis podem variar entre 50-120% para concentrações menores de 1 µg kg⁻¹, 70-110% para concentrações entre 1-10 µg kg⁻¹ e 80-110% para concentrações maiores de 10 µg kg⁻¹. Desta forma, observa-se que a maior parte dos resultados para recuperação foram satisfatórios, pois variaram entre 72-104%, com exceção das recuperações para AFB1 no segundo nível (112%) e AFB1 e AFG1 no terceiro nível (117%). Esses resultados podem ser explicados pela interferência de algum componente da matriz o qual aumenta a intensidade do sinal analítico destes compostos ou, ainda, a contaminação natural do produto analisado (EC 2006; 2010; GILBERT; ANKLAM, 2002).

No que diz respeito aos ensaios de precisão intradia e interdia, foram obtidos resultados satisfatórios, pois os valores de RSD encontrados variaram entre 12-18%, permanecendo abaixo dos 20% preconizados pela AOAC, ISO e União Europeia como limite aceitável para precisão em condições de repetibilidade (GILBERT; ANKLAM, 2002).

A **Figura 15** apresenta o cromatograma da separação de aflatoxinas extraídas de amostras de suco de soja sabor maçã fortificadas e não fortificadas.

Figura 15. Cromatogramas obtidos utilizando o procedimento de HF-DLLME para extração de AFLs em amostras de suco de soja fortificada e não fortificada e posterior detecção por HPLC-FD



Concentrações da fortificação: AFG1 ($4,4 \mu\text{g L}^{-1}$); AFB1; ($4,7 \mu\text{g L}^{-1}$); AFG2 e AFB2 ($1,3 \mu\text{g L}^{-1}$). Condições cromatográficas: Fase móvel isocrática com vazão de $0,8 \text{ mL/min}$ composta de água:metanol:acetonitrila (55:30:15, v/v/v), o tempo total de aquisição de dados foi de 15 min. O detector de fluorescência foi ajustado em comprimento de onda de excitação de 360 nm e comprimento de onda de emissão de 440 nm.

Fonte: Dados primários (2014).

4.3 CONCLUSÕES PARCIAIS

O procedimento proposto, o qual combina as técnicas de extração de HF-LPME e DLLME, apresentou resultados satisfatórios no que diz respeito à extração de AFLs a partir de amostras de suco de soja. As etapas de otimização permitiram a verificação e a escolha das condições ideais de extração para o processo proposto. Além disso, foi possível determinar os parâmetros analíticos de mérito e os resultados foram satisfatórios, segundo normas previstas pelo INMETRO e UE.

Desta forma, o acoplamento das técnicas supracitadas, denominado de HF-DLLME, mostrou-se uma excelente alternativa para a determinação de AFLs em sucos de soja, devido a algumas características tais como: o baixo consumo de solventes orgânicos, o não uso de solventes clorados, não necessidade de centrifugação, baixo custo e fácil aplicação.

Além disso, este novo procedimento, permite a análise simultânea de várias amostras e ainda possui grande potencial para uso em sistemas automatizados e aplicação para outros analitos e outras matrizes, embora a otimização do procedimento deva ser testada e otimizada para novas aplicações.

5 COMBINAÇÃO DE MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDA SUPORTADA EM FIBRA OCA E MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA COMO UMA TÉCNICA RÁPIDA E SENSÍVEL PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE SUCO DE UVA, SEGUIDA DE DETERMINAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Métodos analíticos de extração para agrotóxicos estão constantemente sendo desenvolvidos. Dentre as novas técnicas desenvolvidas merecem destaque àquelas que obedecem aos princípios da química verde, e, nesse contexto, destacam-se as microextrações. Desta forma, neste capítulo é apresentada uma nova técnica para extração de 3 agrotóxicos em amostras de suco de uva, a qual combina a extração com fibra oca (*hollow fiber-HF*) e microextração líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid-liquid microextraction-DLLME*).

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 Químicos e reagentes

Padrões: Os padrões de agrotóxicos sólidos, parationa metílica (99,5 %), clorpirifós (99,7%) foram obtidos da empresa Chem Service (USA) e difenoconazol (97,2%) da Fluka (Milwaukee, WI, USA). Soluções estoques (1000 mg L^{-1}) foram preparadas pela dissolução de quantidade apropriada de cada agrotóxico em metanol. As soluções de trabalho contendo os 3 agrotóxicos foram preparadas na concentração de (10 mg L^{-1}) a partir da diluição apropriada das soluções estoque com metanol e estocadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Solventes: Metanol, Acetonitrila grau HPLC (JT Baker, Center Valley, PA U.S.A) foram utilizados como fase móvel e solventes e dispersores para otimização do método. Acetona grau HPLC e n-octanol, utilizados como dispersor e para o recobrimento da membrana, respectivamente, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Dodecanol e hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazólio [BMIm][PF₆] ($\geq 96\%$) foram obtidos de Vetec e Fluka, respectivamente. Tolueno, n-hexano, e clorofórmio, utilizados como solventes extratores, foram adquiridos da Tedia (Fairfield, OH, USA). Cloreto de Sódio P.A. foi obtido da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil) e água ultra-pura foi obtida a partir de purificação em sistema Mega Purity (Billerica, USA).

5.1.2 Outros materiais

Frascos de 15 e 2 mL da SUPELCO (Supelco, Bellefonte, PA, USA). *Inserts* de polietileno com capacidade de 150 μL da SUPELCO (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Microseringas de 100 e 250 μL modelos 1701N e 1701RN da marca Hamilton (Reno, Nevada, USA). Membranas de polipropileno (PP) Accurel Q3/2 (600 μm d.i., 200 μm espessura da parede e 0,2 μm de tamanho de poro) adquirida da Membrana GmbH (Wuppertal, Alemanha). Também utilizou-se outros equipamentos como: banho termostatizado (Microquímica, Palhoça, Santa Catarina, Brasil); agitadores magnéticos modelo MQAMA 301 (Microquímica, Palhoça, Santa Catarina, Brasil); banho de ultrassom ULTRASONIK 28x (Dentsply Ceramco, York, PA, USA).

5.1.3 Instrumentação

Para a otimização das condições de separação dos agrotóxicos, parationa metílica, difenoconazol e clorpirifós, foram feitas injeções diretas das soluções-padrão de 10 mg L^{-1} dos agrotóxicos individuais em um cromatógrafo a líquido da marca Prominence Shimadzu LC-20AT, com detector por arranjo de diodos (DAD) (Kyoto, Japão) e injetor manual Rheodyne 7725i (Rohnert Park, CA, USA) com *loop* de 20 μL .

A Coluna utilizada para separação cromatográfica dos analitos foi a Shim-pack C18 CLC-ODS (Mseries Shimadzu, Kyoto, Japão) (250 cm x 4,6 mm d.i. x 5 μm d.p.). A fase móvel foi constituída de dois solventes, sendo eles, uma solução aquosa (solvente A) e acetonitrila (solvente B), a uma vazão de 1,0 mL min^{-1} . A programação da eluição por gradiente foi de 95% a 5% de A durante 10 min, manteve-se por mais 10 min. com 5% de A, com o retorno de forma linear para 95% de A durante um minuto. Essa condição foi mantida por mais 4 minutos, totalizando em 25 minutos cada corrida cromatográfica. Os agrotóxicos foram monitorados pelo detector de DAD na faixa 235, 273 e 289 nm.

5.1.4 Procedimentos

Os agrotóxicos são substâncias tóxicas que possuem efeitos deletérios à saúde humana. Desta forma, todos os procedimentos de manuseio dessas substâncias foram realizados com cuidado utilizando os devidos equipamentos de proteção individual e coletiva.

5.1.4.1 Preparo das amostras de suco de uva

As amostras de suco de uva foram adquiridas em supermercados de Florianópolis, Santa Catarina, e foram produzidos na cidade de Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brasil. As embalagens continham 200 mL de suco de uva e foram armazenadas em refrigerador a 4 °C até a análise. Anteriormente ao procedimento de extração, as embalagens eram agitadas manualmente por cerca de 10 s para homogeneização da amostra, logo a amostra não foi submetida a qualquer pré-tratamento. Após este preparo, alíquotas de 9 mL foram submetidas ao procedimento de HF-DLLME.

5.1.4.2 Otimizações

Com o objetivo de obter uma alta eficiência de extração por HF-DLLME para os agrotóxicos estudados em amostras de suco de uva, os parâmetros que afetam a microextração dos analitos, bem como os parâmetros que afetam a dessorção dos agrotóxicos da membrana, foram otimizados. Após a otimização desses parâmetros, foram determinadas as características quantitativas inerentes ao método e, finalmente, o método proposto foi aplicado à amostras reais de suco de uva. Desta forma, o processo de otimização foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa, foram otimizados por procedimentos univariados parâmetros como:

- 1) **Modo de extração:** No modo de extração foram verificadas as influências do recobrimento da membrana com um solvente orgânico, da microextração líquido-líquido dispersiva e o efeito sinérgico entre as duas técnicas. Para a realização deste procedimento, foram utilizados 9 mL de suco de uva fortificados com $250 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito, foram adicionados 500 μL de tampão citrato/fosfato/borato para ajuste do pH em 6. Quanto ao modo de extração foram avaliadas as seguintes condições: (A) com recobrimento e com mistura de solventes extrator:dispensor; (B) com recobrimento e sem a mistura de solventes extrator:dispensor; (C) sem recobrimento e com mistura de solventes extrator:dispensor; (D) com recobrimento, com dispensor e sem extrator. Para todos os procedimentos foram utilizados 2 cm de membrana de polipropileno;
- 2) **Sistema de solventes para dessorção e tempo de**

dessorção: O segundo estudo realizado para a otimização das condições da microextração da técnica de HF-DLLME foi a seleção das condições mais adequadas para a dessorção dos agrotóxicos da membrana de extração. Para a realização deste procedimento, foram utilizados 9 mL de suco de uva fortificados com $250 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito, ao qual foram adicionados $500 \mu\text{L}$ de tampão citrato/fosfato/borato para ajuste do pH em 6. Com a ajuda de uma microseringa foram adicionadas à amostra, rapidamente, $250 \mu\text{L}$ da mistura de hexano:acetona (1:10 v/v) e, então, a membrana microporosa (2 cm) suportada em uma haste de aço inoxidável contendo dodecanol imobilizado foi adicionada ao sistema de microextração. As amostras foram mantidas sob agitação magnética durante 30 min. Os solventes orgânicos testados para dessorção dos analitos foram acetonitrila e metanol, e a faixa de tempo de dessorção estudada variou de 5 a 15 minutos, anteriormente à quantificação dos analitos por HPLC-DAD. Após isto, um gráfico de barras foi construído para representar os resultados obtidos com este procedimento.

- 3) **Solvente de extração imobilizado nos poros da membrana:** Foram estudados diferentes solventes imobilizados nas paredes porosas das fibras ocas de polipropileno, a fim de determinar qual solvente apresentaria maior eficiência de extração dos agrotóxicos estudados em suco de uva. Os solventes testados foram: octanol, tolueno, dodecanol e o líquido iônico hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazólio [BMIm][PF₆]. Uma membrana sem solvente imobilizado também foi utilizada para fins de comparação com os outros dados. Para a realização deste procedimento, aos quais foram utilizados 9 mL de suco de uva fortificados com $250 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito, ao qual foram adicionados $500 \mu\text{L}$ de tampão citrato/fosfato/borato para ajuste do pH em 6. Com a ajuda de uma microseringa foram adicionadas à amostra, rapidamente, $250 \mu\text{L}$ da mistura de hexano:acetona (1:10 v/v) e, então, a membrana microporosa (2 cm) suportada em uma haste de aço inoxidável contendo o solvente imobilizado foi adicionada ao sistema de microextração. As amostras foram mantidas

sob agitação magnética durante 30 min. A dessorção e injeção dos analitos no sistema de HPLC-DAD foi realizada posteriormente.

- 4) **Composição da mistura de solvente extrator/dispersor:** A quarta otimização univariada realizada foi a determinação da melhor mistura de solventes de extração e dispersão adicionados à amostra antes de colocar a membrana de polipropileno com solvente imobilizado (dodecanol). Para este estudo foram testadas diferentes combinações entre os solventes extratores: hexano, tolueno e acetato de butila e os solventes dispersores: metanol, acetonitrila e acetona. Para este procedimento foram utilizados 9 mL de suco de uva fortificados com $250 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito, aos quais foram adicionados 500 μL de tampão citrato/fosfato/borato para ajuste do pH em 6. Com a ajuda de uma microseringa foram adicionadas rapidamente à amostra 250 μL da mistura de extrator/dispersor estudados na razão de 1:10 (v/v) e, então, a membrana microporosa (2 cm) suportada em uma haste de aço inoxidável contendo o solvente imobilizado dodecanol foi adicionada ao sistema de microextração. As amostras foram mantidas sob agitação magnética durante 30 minutos. A seguir foi procedida a dessorção e injeção dos analitos no HPLC-DAD
- 5) **Volume total do sistema de solventes extrator:dispersor adicionado:** A última etapa das otimizações univariadas foi à verificação do volume ideal do sistema de solventes extrator/dispersor adicionado à amostra. Para esta etapa utilizaram-se 9 mL de suco de uva fortificados com $250 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito, aos quais foram adicionados 500 μL de tampão citrato/fosfato/borato para ajuste do pH em 6. Com a ajuda de uma microseringa foram adicionados rapidamente à amostra os volumes estudados de 150, 250 e 350 μL da mistura de hexano:acetona (1:10 v/v) e, então, a membrana microporosa (2 cm) suportada em uma haste de aço inoxidável contendo o dodecanol nos poros foi adicionada ao sistema de microextração. As amostras foram mantidas sob agitação magnética durante 30 minutos. A seguir foi procedida a dessorção e injeção dos analitos no HPLC-DAD.

É importante salientar que todas as otimizações univariadas

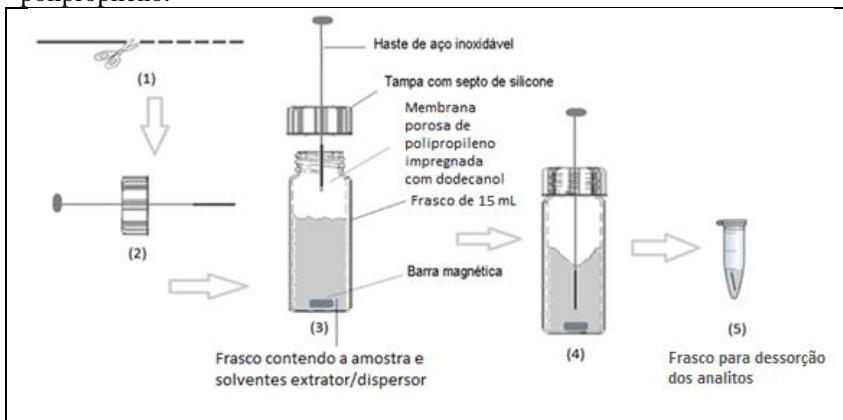
foram realizadas em triplicata para posterior análise dos dados.

Em uma segunda etapa da otimização da técnica de HF-DLLME, foi realizado um planejamento fatorial fracionado em dois níveis (2^{5-1}) com ponto central (C), para a avaliação do efeito significativo de 5 variáveis que poderiam afetar o processo de microextração. Um ponto central realizado em triplicata foi incluído no planejamento para estimar a variância experimental e para determinar a curvatura entre os níveis escolhidos para cada uma das variáveis. O planejamento resultou em 16 experimentos e três repetições para o ponto central e permitiu a determinação da significância das variáveis. Cinco variáveis foram estudadas: volume da mistura extrator/dispersor (150 e 350 μ L), tempo de extração (20 e 60 minutos), razão entre solvente extrator:dispersor (1:10 e 1:5), concentração de sal (0 e 35%, m/v) e pH da amostra (3 e 9).

5.1.4.3 Procedimento otimizado para extração dos 3 agrotóxicos por HF-DLLME em suco de uva

As cinco etapas da metodologia de extração proposta de HF-DLLME para análise de agrotóxicos em suco de uva são apresentadas na **Figura 16**.

Figura 16. Representação esquemática das etapas do procedimento proposto para a microextração HF-DLLME com membrana porosa de polipropileno.



Fonte: Dados primários (2014).

A primeira etapa (1) foi o preparo das membranas tubulares e porosas de polipropileno, as quais foram cortadas em segmentos de 2,0

cm, limpas com acetona (grau HPLC) e secas. O segundo passo (2), foi a fixação de hastes de aço inoxidável com os mesmos diâmetro internos das membranas nos septos de silicones das tampas dos frascos de vidros utilizados para as análises. Foram adicionados os segmentos cortados das membranas, e os mesmos foram totalmente imersos por 15 segundos no solvente de recobrimento (dodecanol). A terceira etapa (3) foi o preparo de alíquotas de 9 mL de suco de uva, as quais foram colocadas em frascos de 15 mL, contendo 0,5 mL de tampão (citrato/fosfato/borato) para ajustar o pH em 6,0, 250 μL uma solução aquosa de 10 mg L^{-1} de uma mistura dos 3 agrotóxicos e 250 μL de uma solução contendo hexano como solvente extrator e acetona como solvente dispersor na razão de 1:7,5 (v:v). Em seguida (4) o frasco foi fechado com a tampa de rosca a qual continha a haste de aço e o segmento de membrana impregnado com o solvente de recobrimento. Cabe ressaltar que a membrana ficou totalmente imersa na solução. Este sistema foi mantido sob agitação constante durante 60 minutos, tempo necessário para que os analitos pudessem ser transferidos das amostras para as membranas (quarta etapa).

5.1.4.4 Procedimento otimizado para dessorção dos 3 agrotóxicos e injeção dos analitos

Ao término da extração a membrana foi retirada e colocada em um frasco de 2 mL contendo *insert* com 100 μL de acetonitrila e este foi então sonicado durante 10 minutos para dessorção dos analitos da membrana (quinta etapa). Após o término da etapa de dessorção, 20 μL da solução final foi injetada diretamente no HPLC-DAD.

5.1.4.5 Curva analítica e parâmetros analíticos de mérito

Sob as condições ótimas anteriormente mencionadas, foram investigadas as figuras de mérito do método proposto, como, limites de detecção, limites de quantificação, faixas lineares de trabalho, as equações de regressão linear e outras características do método, com o objetivo de avaliar o desempenho analítico do mesmo.

As curvas analíticas foram construídas com os dados obtidos nas análises da amostra de suco de uva contendo os analitos em sete concentrações diferentes, variando entre 10 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os dados utilizados para a construção da curva analítica foram obtidos em triplicata. O LOD, foi calculado como $3\sigma/B$, onde σ é o SD do coeficiente linear da curva analítica e B é a inclinação da curva analítica,

já o LOQ foi calculado como $10\sigma/B$.

A precisão do método foi expressa como o RSD em condições de repetibilidade e foi calculada a partir de seis replicatas de uma solução contendo uma mistura de agrotóxicos ($100 \mu\text{g L}^{-1}$, $250 \mu\text{g L}^{-1}$ e $500 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada agrotóxico).

Duas amostras de suco de uva puro (Suconelli e Aurora) foram utilizadas para a determinação da exatidão da técnica proposta de HF-DLLME na extração/pré-concentração dos agrotóxicos selecionados. Uma vez que, nenhum material de referência certificado semelhante às amostras analisadas neste estudo estava disponível, testes de recuperação foram realizados utilizando a técnica de adição padrão em três níveis diferentes.

5.1.4.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram plotados e analisados utilizando ferramentas estatísticas disponíveis nos software Statistica 8 e OriginPro 8.

5.1.5 Comparação do método de HF-DLLME com outras técnicas de preparo de amostras

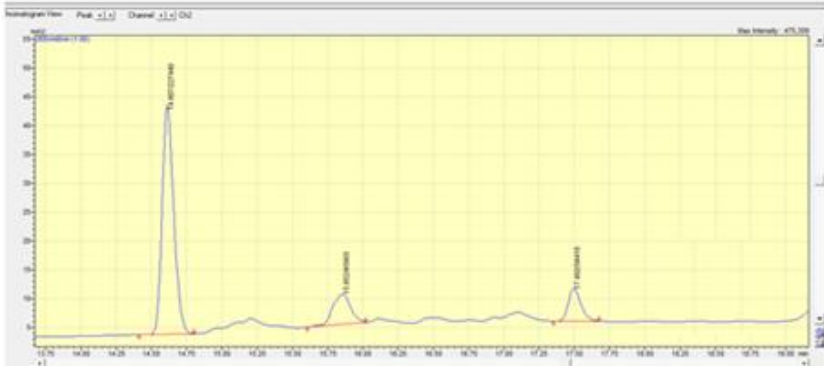
Após otimização da técnica proposta e a determinação de algumas figuras de mérito, foi realizada uma comparação entre a de HF-DLLME e outras técnica de microextração já desenvolvidas e propostas por outros autores. A comparação foi realizada por meio de um levantamento bibliográfico, realizado na literatura internacional, no qual foram comparadas técnicas de microextração para a análise dos agrotóxicos parationa metfílica, difenoconazol e clorpirifós em amostras semelhantes ao suco de uva. Algumas das características comparadas entre os métodos foram: faixa linear de trabalho, LOD e tempo estimado de extração.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente serão apresentados os resultados referente as condições experimentais cromatográficas obtidas para análise dos agrotóxicos na amostra de suco de uva.

Na **Figura 17**, está apresentado um cromatograma típico de uma mistura dos 3 agrotóxicos nestas condições. Os dados cromatográficos foram analisados pelo software LCSolution (Shimadzu, Kyoto, Japão).

Figura 17. Cromatograma obtido por HPLC-DAD usando uma mistura de solução padrão de 10 mg L⁻¹ dos agrotóxicos: Parationa metílica (pico 1), Difenconazol (pico 2) e Clorpirifós (pico 3).



Condições cromatográficas: Fase móvel foi constituída de dois solventes, sendo eles, uma solução aquosa (solvente A) e acetonitrila (solvente B), a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹. O programa de eluição por gradiente foi de 95% a 5% de A durante 10 min, manteve-se por mais 10 min. com 5% de A, com o retorno de forma linear para 95% de A durante um minuto. Essa condição foi mantida por mais 4 minutos, totalizando em 25 minutos cada corrida cromatográfica. Os agrotóxicos foram monitorados pelo detector de DAD 265 nm.

Fonte: Dados primários (2014).

O tempo de retenção, bem como o comprimento de onda de absorção máxima para cada composto estão apresentados na **Tabela 12**.

Tabela 12. Valores de comprimento de onda de absorção máxima e tempo de retenção para cada .agrotóxico

Agrotóxico	λ (nm)	Tempo de retenção (min)
Parationa metílica	273	14,6
Difenconazol	235	15,9
Clorpirifós	289	17,5

Fonte: Dados primários (2014).

A partir da definição das condições cromatográficas para a análise dos 3 agrotóxicos estudados, foram procedidas as otimizações da técnica de HF-LPME. Os resultados das otimizações univariadas e multivariadas estão descritos a seguir.

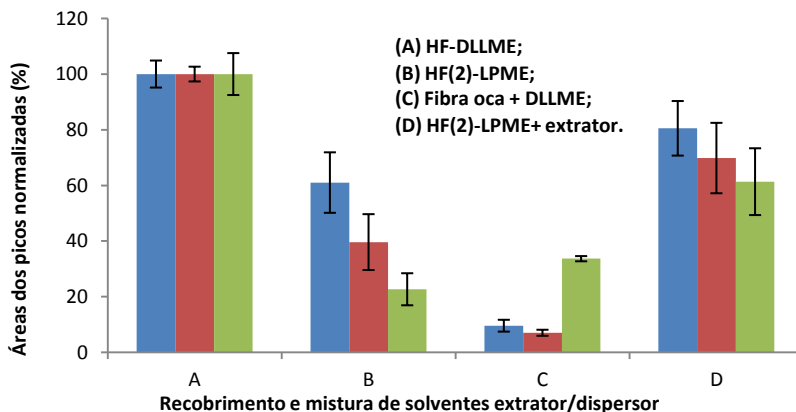
5.2.1 Otimização dos parâmetros que afetam extração dos agrotóxicos em amostra de suco de uva utilizando a metodologia de HF-DLLME

Com o objetivo de obter uma alta eficiência de extração por HF-DLLME para os agrotóxicos estudados em amostras de suco de uva, foram otimizados os parâmetros que afetam a microextração dos analitos, bem como os parâmetros que afetam a dessorção dos agrotóxicos da membrana. Após a otimização desses parâmetros, foram determinadas as características quantitativas inerentes ao método e, finalmente, o método proposto foi aplicado à amostras reais de suco de uva comercializados em supermercados de Florianópolis e produzidos em vinícolas do estado de Santa Catarina e da serra do Rio Grande do Sul.

5.2.1.1 Seleção do modo de microextração

A fim de verificar a importância do recobrimento da membrana com um solvente orgânico e a extração líquido-líquido dispersiva, a microextração foi realizada em diferentes condições. São elas: (A) HF-DLLME; (B) HF-PLME de duas fases; (C) sem recobrimento e com DLLME; (D) HF-LPME com solvente extrator.

Figura 18. Estudo dos efeitos do recobrimento da membrana no uso da microextração líquido-líquido dispersiva para extração dos agrotóxicos parationa metílica (■) difenoconazol (■) e clorpirifós (■) em suco de uva, seguida da detecção por HPLC-DAD.



Fonte: Dados primários (2014).

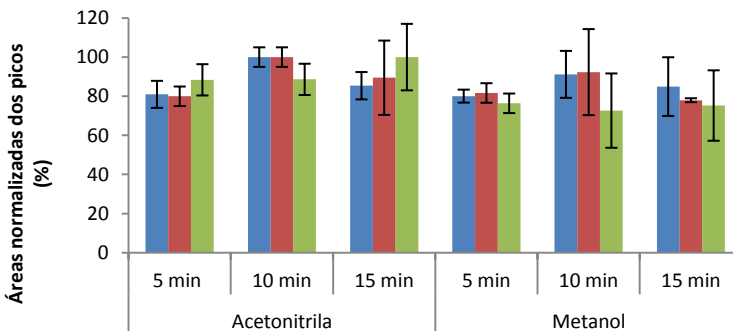
Na **Figura 18** foram apresentados os resultados das condições aplicadas em relação à resposta percentual normalizada dos picos dos analitos.

Comparando os diferentes modos de extração testados através das áreas normalizadas dos picos, fica evidente que o recobrimento exerce um papel fundamental para a extração dos analitos. Fica claro também que a presença dos solventes extratores e dispersores também acarretam em melhora do sinal analítico, sendo este provavelmente devido à fatores cinéticos. Considerando que a extração dos analitos pelo modo A foi mais eficiente que as extrações usando tanto o modo B quanto aos modos C e D. Conclui-se que existem evidências de que a microextração líquido-líquido dispersiva, bem como o recobrimento da membrana, desempenham uma influência positiva sobre o sinal analítico dos analitos estudados. O modo de extração com recobrimento e com a mistura de solventes extrator/dispersor foi, portanto, escolhido como condição ótima.

5.2.1.2 Seleção do solvente e tempo para dessorção dos analitos da membrana

O primeiro estudo realizado para a otimização das condições da microextração da técnica de HF-DLLME foi a seleção das condições mais adequadas para a dessorção dos agrotóxicos da membrana de extração, em relação ao solvente e tempo de dessorção. Os resultados obtidos neste estudo estão apresentados na **Figura 19**.

Figura 19. Estudo do tipo de solvente e tempo de dessorção dos analitos após extração por HF-DLLME, seguido por análise por HPLC-DAD. Agrotóxicos: parationa metílica (■) difenoconazol (■) e clorpirifós (■).



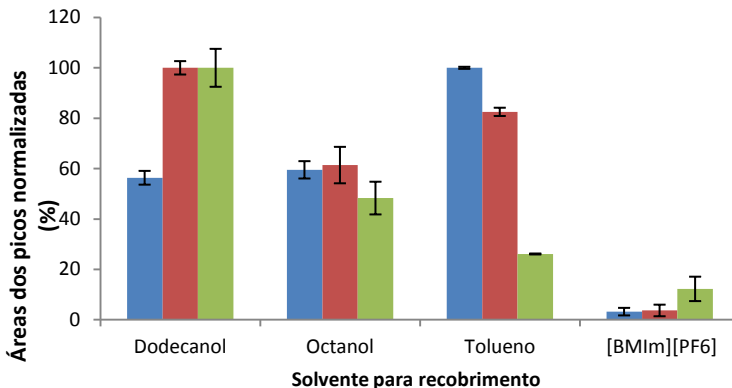
Fonte: Dados primários (2014).

Observou-se que a eficiência da extração aumentou à medida que o tempo de dessorção aumentou para ambos os solventes de dessorção, mais perceptível 5-10 minutos. Com base nos resultados, o tempo de dessorção foi fixado em 10 minutos, utilizando acetonitrila como solvente. Um aumento no sinal entre os tempos de dessorção de 10 a 15 minutos foi verificado, porém esta variação foi considerada não significativa devido ao desvio encontrado. Logo, o uso de 15 minutos como tempo de dessorção produziria uma perda da frequência analítica. A acetonitrila foi escolhida como solvente de dessorção, pois este solvente apresentou melhor eficiência para os analitos difenoconazol e clorpirifós, enquanto metanol apresentou melhor poder de dessorção para parationa metílica. É importante ressaltar ainda, que acetonitrila proporciona um melhor perfil gaussiano dos picos, ou seja, evita a distorção dos picos.

5.2.1.3 Seleção do solvente orgânico para recobrimento dos poros da membrana

O solvente orgânico usado para preencher e recobrir os poros da membrana é muito importante em termos da obtenção de uma eficiência de extração satisfatória. O solvente orgânico deve ser insolúvel em água, ter uma boa afinidade com o polipropileno da membrana e com os analitos objetos de estudo, e ter baixa volatilidade para evitar as perdas de solvente durante o processo de extração (BEN-HANDER *et al.*, 2015). A composição deste solvente de recobrimento da membrana altera o coeficiente de difusão da substância e também o coeficiente de partição do analito entre a membrana e a amostra. Assim, quatro solventes orgânicos diferentes (dodecanol, octanol, tolueno e um líquido iônico hidrofóbico (IL) [BMIm][PF6]) foram investigados (Figura 20).

Figura 20. Estudo do efeito do tipo de solvente orgânico utilizado para o recobrimento da membrana para extração dos agrotóxicos parationa metflica (■) difenoconazol (■) e clorpirifós (■) em suco de uva, pela técnica de HF-DLLME, seguida por detecção em HPLC-DAD



Fonte: Dados primários (2014).

Como pode ser observado na **Figura 20**, o dodecanol apresentou a melhor eficiência de extração para difenoconazol e clorpirifós, e o tolueno foi o solvente mais adequado para a extração da parationa metflica. Já os solventes, octanol e o líquido iônico mostraram pequena capacidade de extração para os três agrotóxicos pesquisados. Portanto, o dodecanol foi selecionado como solvente orgânico para o revestimento dos poros da membrana em experiências subsequentes.

5.2.1.4 Seleção da mistura de solventes extrator/dispersor

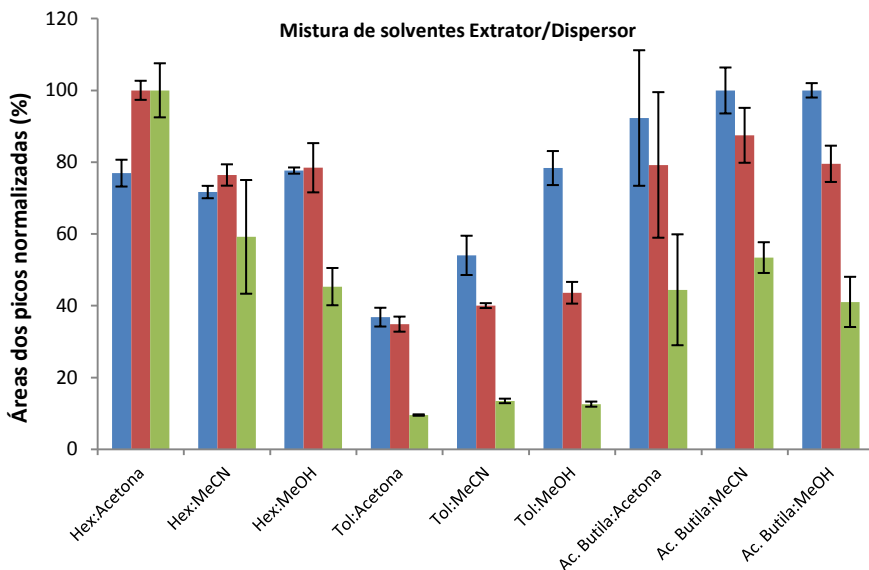
Como observado anteriormente, na **Figura 20**, ficou evidenciado que a mistura de solventes extrator/dispersor exerce um efeito significativo na extração dos analitos. Para tanto, é justificado o estudo aprofundado de diferentes pares de sistema de solventes extrator/dispersor.

A seleção de uma mistura apropriada de solventes extrator/dispersor é de grande importância para a otimização do método HF-DLLME. O solvente de extração deve apresentar características diferentes das do solvente dispersor, portanto pode ter uma densidade maior ou menor do que a água (dependendo do sistema de extração utilizado), baixa solubilidade em água e alta capacidade de extrair os analitos alvo. Para a escolha do solvente de dispersão em HF-DLLME, a sua miscibilidade com a fase orgânica (solvente de extração) e com a

fase aquosa (solução de amostra) são os principais fatores que permitem a dispersão em gotículas muito finas do solvente de extração na fase aquosa (XIONG; HU, 2008; FARAJZADEH; DJOZAN; KHORRAM, 2012). Considerando estas características, alguns sistemas de solventes extratores e dispersores (9 combinações de pares de solventes) foram estudados para a extração dos agrotóxicos a partir de amostras de suco de uva. Os solventes extratores estudados foram: n-hexano, tolueno e acetato de butila; já os solventes dispersores estudados foram: acetona, acetonitrila e metanol.

Os resultados obtidos para todas as misturas de solventes extrator/dispersor na extração dos agrotóxicos podem ser observados na **Figura 21**.

Figura 21. Estudo da influência da mistura de solventes extrator/dispersor na eficiência de extração dos agrotóxicos parationa metílica (■) difenoconazol (■) e clorpirifós (■) em suco de uva, usando a técnica de HF-DLLME e detecção por HPLC-DAD.



Fonte: Dados primários (2014).

Estes resultados demonstram que o n-hexano na presença de acetona como o solvente de dispersão forma um sistema de duas fases mais estável e mais eficiente para extração do difenoconazol e clorpirifós. No entanto, para extrair a parationa metílica a mistura de

solventes de acetato de butila com acetona, acetonitrila ou metanol, forneceu melhores resultados. Foram observadas perdas significativas dos analitos quando o tolueno foi usado como o solvente de extração combinado tanto com acetona, acetonitrila ou metanol como solventes de dispersão. Por esta razão, hexano e acetona foram escolhidos como melhores solventes de extração e de dispersão, respectivamente.

5.2.1.5 Otimização multivariada

Com o objetivo de concluir a etapa de otimização da técnica de HF-DLLME para a determinação de 3 agrotóxicos em sucos de uva, um planejamento fatorial fracionado em dois níveis (2^{5-1}) com ponto central (C) em triplicata foi realizado. Os valores reais das variáveis nos níveis estudados, a matriz do planejamento fatorial fracionário $2^{5-1}+C$ e as respostas obtidas (calculadas como a média geométrica das áreas dos picos da parationa metúlica, difenoconazol e clorpirifós) estão apresentados na **Tabela 13**.

Tabela 13. Níveis, variáveis, matriz e a resposta obtida para o planejamento fatorial fracionado $2^{5-1}+C$ na extração de agrotóxicos por HF-DLLME e detecção por HPLC-DAD

Variáveis		Símbolo	Níveis			
			-1	0	+1	
Volume da mistura extrator:dispersor (μL)		VME:D	150	250	350	
Tempo (min)		T	20	40	60	
Razão extrator:dispersor (v:v)		E:D	1:10	1:75	1:5	
Sal (%)		Sal	0	17	35	
pH da amostra		pH	3	6	9	
Extrações	VME:D	T	E:D	Sal	pH	Resposta ^s
1	-1	-1	-1	-1	1	68627,87
2	1	-1	-1	-1	-1	55185,84
3	-1	1	-1	-1	-1	122067,8
4	1	1	-1	-1	1	120166,3
5	-1	-1	1	-1	-1	58131,5
6	1	-1	1	-1	1	48985,23
7	-1	1	1	-1	1	113259,2
8	1	1	1	-1	-1	76283,72
9	-1	-1	-1	1	-1	4341,134
10	1	-1	-1	1	1	5956,858
11	-1	1	-1	1	1	10508,23
12	1	1	-1	1	-1	6396,344
13	-1	-1	1	1	1	4624,777
14	1	-1	1	1	-1	5944,782
15	-1	1	1	1	-1	10801,51

Extrações	VME:D	T	E:D	Sal	pH	Resposta ^a
16	1	1	1	1	1	12355,88
17	0	0	0	0	0	15730,58
18	0	0	0	0	0	25278,54
19	0	0	0	0	0	36987,26

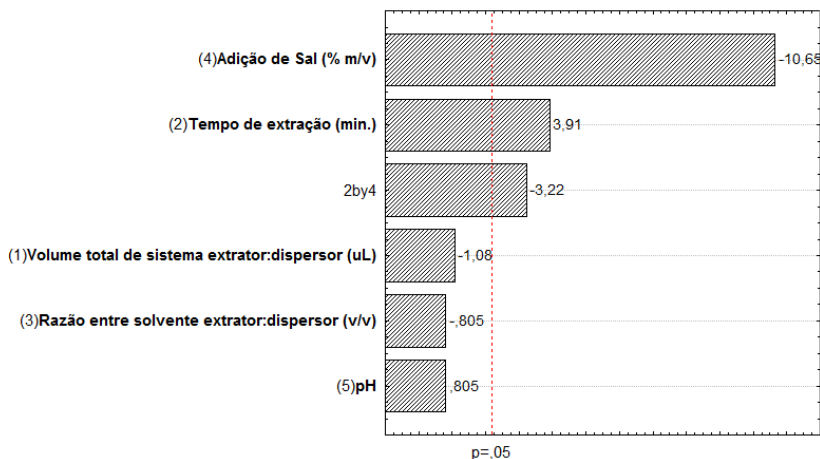
a) Média geométrica das áreas dos picos da parationa metflica, difenoconazol e clorpirifós.

Fonte: Dados primários (2014).

A partir da matriz apresentada na **Tabela 12** foi possível construir o diagrama de Pareto. Neste gráfico, a variável é considerada significativa no processo de extração, quando sua respectiva barra é interceptada transversalmente pela linha do valor $p = 0,05$, indicando variação estatisticamente significativa com 95% de intervalo de confiança. O diagrama de Pareto obtido a partir das respostas apresentadas na **Tabela 12**, a análise de variância (ANOVA) e P -values, podem ser observados na **Figura 22**.

Para a construção do diagrama de Pareto foram ignoradas todas as interações de dois fatores com exceção da interação entre os fatores 2 (tempo de extração) e 4 (adição de sal). As interações foram ignoradas, uma vez que no estudo individual de cada agrotóxico apenas a interação 2 por 4 foi estatisticamente significativa

Figura 22. Diagrama de Pareto obtido através do planejamento fatorial fracionado para otimização das variáveis e suas interações para análise de agrotóxicos em suco de uva utilizando HF-DLLME e detecção por HPLC-DAD.



Fonte: Dados primários (2014).

Tabela 14. Resultados obtidos por meio da análise de variância simples (ANOVA - *one way*) das variáveis significativas para o procedimento de HF-DLLME na determinação de agrotóxicos em suco de uva.

ANOVA; Var.: Média Geométrica; R-sqr=,92191; Adj:,88287
 2**(5-1) design; MS Residual=198385E3
 DV: Média Geométrica

Fatores	SS	df	MS	F	p
(1)Volume total de sistema extrator:dispersor (uL)	2,33E+08	1	2,33E+08	1,18	0,29955146
(2)Tempo de extração (min.)	3,03E+09	1	3,03E+09	15,25	0,00208875
(3)Razão entre solvente extrator:dispersor (v/v)	1,29E+08	1	1,29E+08	0,65	0,43629301
(4)Adição de Sal (% m/v)	2,25E+10	1	2,25E+10	113,52	0,00000018
(5)pH	1,28E+08	1	1,28E+08	0,65	0,43669351
2 by 4	2,06E+09	1	2,06E+09	10,40	0,00729697
Error	2,38E+09	12	1,98E+08		
Total SS	3,05E+10	18			

Fonte: Dados primários (2014).

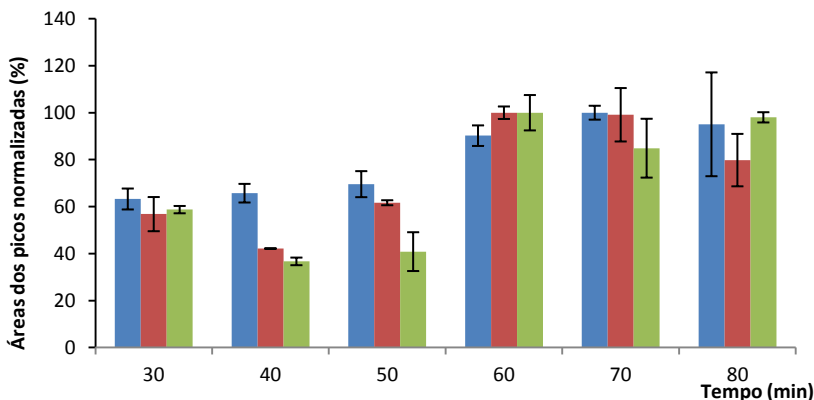
Os resultados mostram que os parâmetros tempo de extração e adição de sal têm efeito significativo sobre a extração dos agrotóxicos estudados utilizando a técnica de HF-DLLME. No entanto, as variáveis volume e proporção dos solventes de extrator/dispersor e pH da amostra não foram significativos para o procedimento de extração. Como pode ser observado, o tempo de extração apresentou um efeito positivo no caso dos agrotóxicos investigados, uma vez que o aumento do tempo de extração acarretou um aumento significativo na eficiência de extração dos analitos. Em contrapartida, a adição de sal mostrou um efeito negativo sobre a extração dos analitos. Assim, neste caso, não é apropriado a adição de sal para a extração dos agrotóxicos na amostra de suco de uva. Em geral, a adição de um sal diminui a solubilidade dos analitos na fase aquosa e aumenta a sua extração para a fase orgânica (ALVES *et al.*, 2012; ABU-BAKAR; MAKAHLEH; SAAD, 2014). No entanto, isto não foi observado neste estudo, provavelmente porque os analitos são moléculas com baixa solubilidade em água.

Também através da análise de variância foi possível observar que os valores de *F* foram estatisticamente significativo para estas variáveis, o que permite concluir que existe uma maior dispersão de valores entre os fatores estudados em relação resultados dentro da mesma variável.

Uma vez que as demais variáveis avaliadas não apresentaram colaboração significativa para o processo de extração dos agrotóxicos estudados em suco de uva por HF-DLLME, somente o tempo de

extração foi otimizado novamente. Nesta oportunidade, essa variável foi otimizada utilizando-se a abordagem univariada, para maximizar a eficiência de extração e frequência analítica. Os resultados deste estudo são mostrados na **Figura 23**.

Figura 23. Otimização do tempo de extração para extração dos agrotóxicos parationa metílica (■) difenoconazol (■) e clorpirifós (■) em suco de uva usando HF-DLLME e detecção por HPLC-DAD.



Fonte: Dados primários (2014).

O tempo de extração ótimo para os agrotóxicos estudados foi definido em 60 min, uma vez que nesse tempo os analitos difenoconazol e clorpirifós apresentaram a melhor eficiência de extração e para a parationa metílica a eficiência foi maior que 90%.

Após a otimização do tempo de extração para a técnica de HF-DLLME para a determinação de 3 agrotóxicos em suco de uva, as condições ótimas para técnica foram: membranas (2cm) recobertas com dodecanol; volume de 9 mL de suco de uva sem adição de NaCl, em pH 6; volume de 250 μ L de sistema de solventes extrator:dispersor (hexano:acetona) na razão de 1:7,5 (v:v); tempo de 60 min. de extração sob agitação magnética constante; dessorção em 100 μ L de acetonitrila por 10 min. em banho de ultrassom.

5.2.2 Curva analítica e parâmetro analíticos de mérito

Sob as condições ótimas anteriormente mencionadas, foram investigadas as figuras de mérito do método proposto, como, limites de detecção, limites de quantificação, faixas lineares de trabalho, as

equações de regressão linear e outras características do método, com o objetivo de avaliar o desempenho analítico do mesmo. Os resultados são apresentados na **Tabela 15**.

Tabela 15. Figuras de mérito para determinação de agrotóxicos em suco de uva utilizando HF-DLLME e detecção por HPLC-DAD

Agrotóxicos	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LR ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Curva analítica	R^2	RSD(%)		
						a	b	c
Parationa metílica	17	58	58-500	$Y = -1404 + 811,2X$	0,9983	6,2	11,4	5,5
Difenoconazol	19	62	62-500	$Y = -4344 + 1425X$	0,9980	3,5	13,8	6,2
Clorpirifós	32	107	107-500	$Y = -2462 + 141X$	0,9942	11,2	16,3	10,8

a) RSD 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 6$); b) RSD 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 3$); c) RSD 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 3$)

LR – Faixa linear de trabalho

Fonte: Dados primários (2014).

Os resultados mostram uma excelente linearidade para todos os analitos com coeficientes de correlação (R^2) maiores que 0,9942. Além disso, verificou-se que os valores de LOD e LOQ obtidos para a extração da parationa metílica difenoconazol e clorpirifós utilizando a técnica de HF-DLLME foram satisfatórios, uma vez que ambos os limites de detecção e quantificação obtidos foram muito abaixo das concentrações máximas permitidas (clorpirifós 0,5 mg kg^{-1} , difenoconazol 0,1 mg kg^{-1} e parationa metílica 0,5 mg kg^{-1}), tal como definido pelo *Codex Alimentarius* para estes agrotóxicos nas uvas. Segundo a Anvisa (2002; 2008) os limites máximos de resíduos para difenoconazol e clorpirifós em uvas são, 200 e 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente. Parationa metílica não é permitido para o tratamento da uva e seus LMR nas mais diversas culturas variam entre 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para cultura de feijão até 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o algodão.

O método também mostrou precisão aceitável, pois os valores de RSD (%) para as concentrações estudadas variaram entre 3,5 e 16,3%.

De acordo com estes resultados conclui-se que a técnica de HF-DLLME apresenta detectabilidade e aplicabilidade adequada aos padrões normativos atuais, no Brasil e exterior, para a determinação de agrotóxicos em amostras de suco de uva.

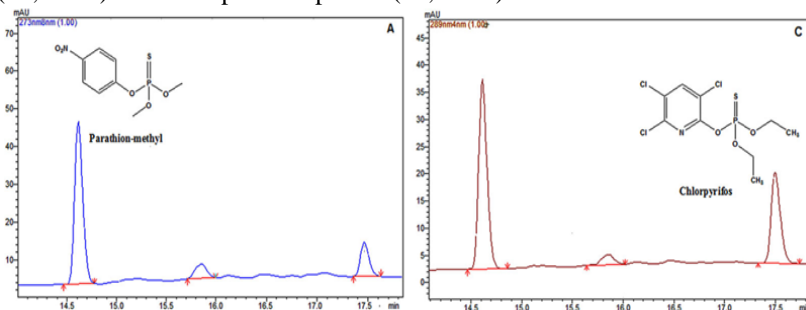
5.2.3 Análise de amostras de suco de uva integral

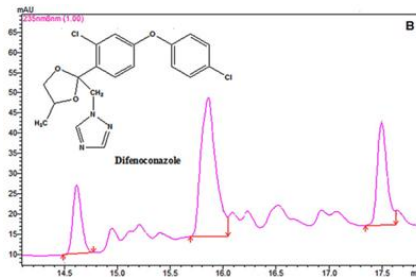
Para avaliar o desempenho do método aqui apresentado, duas amostras de suco de uva puro (Suconelli e Aurora), adquiridas em um supermercado local, foram analisadas. Uma vez que nenhum material de

referência certificado semelhante às amostras analisadas neste estudo estava disponível, testes de recuperação foram realizados utilizando a técnica de adição padrão para verificar a exatidão do método.

Para a amostra de suco da marca Suconelli, as equações das curvas analíticas para parationa metílica, difenoconazol e clorpirifós foram, respectivamente, $Y = -5274,7 + 863,6X$, $Y = -2672,3 + 615,8X$ e $Y = -2281,9 + 166,7X$. Para a amostra de suco de Aurora, as equações correspondentes foram $Y = -8118,9 + 856,9X$, $Y = -6990,7 + 726,8X$ e $Y = -3936,9 + 215,4X$. Foram obtidos bons valores para as recuperações de parationa metílica, cerca de 105%, em amostras de suco de uva. Em contrapartida, para difenoconazol e clorpirifós as recuperações a partir da matriz foram baixas para o primeiro (entre 43 e 51%) e elevada para o último (entre 117 e 152%), indicando uma interferência de alguns dos componentes da matriz do suco no processo analítico de extração. Estes resultados indicam que o processo HF-DLLME deve ser calibrado para cada amostra a ser analisada, utilizando uma curva de adição de analito. O procedimento de diluição da amostra, que pode ser uma ferramenta para diminuição do efeito matriz em um procedimento de extração, não foi testado, pois um dos principais objetivos deste estudo foi analisar a amostra apenas realizando a sua homogeneização anteriormente a aplicação da técnica de HF-DLLME. Além disso, verificou-se que os valores obtidos para os três agrotóxicos em ambas as amostras foi inferior ao limite de detecção do método. Um cromatograma típico obtido neste estudo pode ser visto na **Figura 24**.

Figura 24. Cromatogramas de suco de uva fortificado com os três agrotóxicos ($277 \mu\text{g L}^{-1}$) detectados por HPLC–DAD. Registros realizados em 235 nm para difenoconazol (15,9 min), 273 nm para parationa metílica (14,6 min) e 289 nm para clorpirifós (17,5 min)





Condições cromatográficas: Fase móvel foi constituída de dois solventes, sendo eles, uma solução aquosa (solvente A) e acetonitrila (solvente B), a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹. O programa de eluição por gradiente foi de 95% a 5% de A durante 10 min, manteve-se por mais 10 min. com 5% de A, com o retorno de forma linear para 95% de A durante um minuto. Essa condição foi mantida por mais 4 minutos, totalizando em 25 minutos cada corrida cromatográfica. Os agrotóxicos foram monitorados pelo detector de DAD na faixa 235, 273 and 289 nm.

Fonte: Dados primários (2014).

5.2.4 Comparação do método de HF-DLLME com outros métodos de concentração de amostras

A **Tabela 16** mostra que o método proposto apresenta semelhante desempenho de extração para os analitos alvo, quando comparado com outros métodos relatados, considerando os aspectos, tais como tempo de extração, intervalo linear e LOD.

Tabela 16. Comparação do método proposto de HF-DLLME com outras técnicas de pré-concentração para determinação dos agrotóxicos estudados.

Agrotóxico	Matriz	Técnica de preparo	Tempo de extração (min)	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$) ou ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$) ou ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Referência
Difenoconazol	Suco de laranja	HF-MMLLE ^a	35	200–10000	60	(BEDENDO; JARDIM; CARASEK, 2010)
	Mel	ET-DLLME	12	0,2–45	0,07	(FARAJZADEH; MOGADDAM; GHORBANPOUR, 2014)
	Suco de uva	HF-DLLME	60	62–500	19	Este método
Clorpirifós	Suco de laranja	HF-MMLLE ^a	35	200–10000	70	(BEDENDO; JARDIM; CARASEK, 2010)
	Uva, melancia, melão	VLLME-SID ^b	1 ^c	0,5–500	0,05	(SEEBUNRUENG; SANTALADCHAIYAKIT; SRIJARANAI, 2015)
	Suco de uva	HF-DLLME	60	107–500	32	Este método
Parationa metílica	Uva, melancia, melão	VLLME-SID ^b	1 ^c	1–500	0,3	(SEEBUNRUENG; SANTALADCHAIYAKIT; SRIJARANAI, 2015)
	Tecido bovino	MSPD-SPE ^d	---	500–10000	40	(GUTIÉRREZ VALENCIA; GARCÍA DE LLASERA, 2011)
	Suco de uva	HF-DLLME	60	58–500	17	Este método

- a) Extração com fibra oca acoplada com extração líquido-líquido em membrana microporosa (HF-MMLLE) e detecção por LC-MS/MS
- b) Microextração líquido-líquido com solvente de baixa densidade assistida por Vórtex acoplada a desemulsificação induzida por sal (VLLME-SID) detecção por HPLC
- c) Tempo de preparo de amostra não foi relatado no estudo.
- d) Dispersão da matriz em fase sólida acoplada com extração em fase sólida (MSPD-SPE) e detectada por HPLC-DAD
- e) Microextração líquido-líquido dispersiva combinada a temperatura elevada acoplada com GC com detector de Nitrogênio e Fósforo.

O tempo de extração da técnica de HF-DLLME foi um pouco mais longo do que a média, porém apresentou menor LOD quando comparado com técnicas semelhantes, usando fibras ocas com o mesmo tipo de matriz. Em relação aos métodos DLLME, cabe ressaltar que a técnica proposta de HF-DLLME não requer centrifugação das amostras, logo necessitam de menor manuseamento da amostra, o que reduz a probabilidade de perda de analitos ou contaminação da amostra. Além disso, é importante enfatizar que o LOD foi calculado utilizando os parâmetros da curva, o que geralmente acarreta valores superiores, porém mais realistas quando comparado com aqueles métodos que utilizam a relação sinal/ruído. A faixa linear de trabalho foi menor, principalmente, devido à elevada detectabilidade do método. Por isso, HF-DLLME apresenta eficiência de extração semelhante a outras técnicas de extração, porém é menos laboriosa.

5.3 CONCLUSÕES PARCIAIS

O método desenvolvido por HF-DLLME seguido de análise por HPLC-DAD apresentou-se eficiente para a extração e concentração dos agrotóxicos parationa metílica, difenoconazol e clorpirifós analisados a partir de amostras de sucos de uva. Esta metodologia é de fácil aplicação, utiliza pequenas quantidades de solventes orgânicos sem necessitar de solventes clorados. Desta forma, considera-se o método proposto ecologicamente correto mostrando grande potencial para aplicação na determinação de outros contaminantes alimentares e ambientais. Além disso, o método apresentou detectabilidade suficiente para a determinação destes agrotóxicos, e como toda a otimização foi realizada na própria matriz, espera-se efeitos de matriz mínimos para aplicação da metodologia em amostras de suco de uva de origens diversas. A utilização da membrana porosa de polipropileno possibilitou uma excelente limpeza da amostra, concomitantemente com a concentração.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi proposta, pela primeira vez, a combinação simultânea das técnicas de HF-LPME e DLLME para aplicação direta em sucos. A partir deste conceito, dois estudos foram desenvolvidos utilizando a metodologia proposta, a qual foi denominada de microextração líquido-líquido dispersiva suportada com membrana oca (HF-DLLME).

O primeiro estudo foi à determinação de aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2) em suco de soja por HPLC-FLD. O segundo estudo realizado foi a determinação de 3 agrotóxicos (parationa metílica, difenoconazol e clorpirifós) em suco de uva utilizando a técnica proposta e posterior quantificação por HPLC-DAD. Dentre as principais vantagens encontradas com o uso desta abordagem, em comparação com técnicas tradicionais de preparo de amostra como LLE ou ainda técnicas modernas como DLLME, destacam-se: o aumento da seletividade, uma vez que a fibra oca devido à suas características microporosas serve como um filtro para exclusão de macromoléculas (p.ex. proteínas); o uso de pequenas quantidades de solventes orgânicos; não utilização de solventes clorados. Cabe ressaltar, que neste estudo não foram utilizadas outras técnicas para purificação/diluição da amostra, anterior a etapa de extração, ou seja, as amostras passaram somente pelo processo de homogeneização por agitação manual.

Quanto aos parâmetros analíticos ou figuras de mérito os resultados dos dois estudos mostraram-se satisfatórios quanto aos requisitos de precisão intra e interdia e exatidão, estabelecidos pelas principais órgãos normalizadores de metodologias analíticas.

Apesar de a HF-DLLME apresentar tempo de análise longo (70-90 min.) ela permite a extração simultânea de amostras, aumentando a frequência analítica da técnica. Além disso, esta nova técnica tem um grande potencial para uso em sistemas automatizados como *Well Blade 96* o que acarretaria menor tempo de análise para uma amostra (1-2 min.). Também foi observado efeito matriz quando a técnica foi aplicada em sucos concentrados de uva, porém esse problema pode ser facilmente solucionado utilizando artifícios como a diluição da amostra e fazendo a calibração dos analitos com padrão interno.

É importante enfatizar, que o controle de qualidade de sucos de frutas, bem como de produtos derivados da soja, quanto à contaminação por aflatoxinas e agrotóxicos é de grande importância. Isso se deve, pois estes produtos além de serem amplamente produzidos e consumidos no Brasil, são comumente direcionados ao público infantil.

Além disso, no caso da determinação de aflatoxinas em suco de soja, os programas governamentais, ainda não incluem ou especificam os níveis toleráveis dessas micotoxinas em produtos derivados dessa leguminosa. Não obstante, existe a necessidade da regulamentação dos LMR nesses produtos, uma vez que são passíveis de contaminação. Em contrapartida, as regulamentações para os três agrotóxicos, estão bem documentadas para uvas de mesa e para produção de vinho, porém ainda há a necessidade da inclusão de outros tipos de derivados como é o caso dos sucos.

Embora não existam LMR específicos para os compostos nas matrizes estudadas, os LOD e LOQ, obtidos em ambos os trabalhos, atendem aos LMR estabelecidos pelos principais órgãos reguladores nacionais e internacionais se comparados com matrizes similares.

Portanto, a partir dos resultados encontrados verificou-se que a combinação das técnicas de HF e DLLME é um procedimento eficiente para a extração de aflatoxinas e agrotóxicos em sucos de soja e de uva, respectivamente. Além disso, a técnica de HF-DLLME apresenta-se como uma excelente alternativa devido a algumas características, tais como: baixo consumo de solvente orgânico, não uso de solventes clorados, não necessidade de centrifugação, baixo custo e fácil aplicação. Além disso, esta nova técnica tem um grande potencial para uso em sistemas automatizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-BAKAR, N.-B.; MAKAHLEH, A.; SAAD, B. Vortex-assisted liquid–liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of furfurals and patulin in fruit juices. **Talanta**, v. 120, n. 0, p. 47-54, 2014. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914013009697> >.

AFZALI, D.; GHANBARIAN, M.; MOSTAFAVI, A.; SHAMSPUR, T.; GHASEMINEZHAD, S. A novel method for high preconcentration of ultra trace amounts of B1, B2, G1 and G2 aflatoxins in edible oils by dispersive liquid–liquid microextraction after immunoaffinity column clean-up. **Journal of Chromatography A**, v. 1247, p. 35-41, 2012. ISSN 00219673.

ALVES, A. C. H.; GONÇALVES, M. M. P. B.; BERNARDO, M. S.; MENDES, B. Dispersive liquid–liquid microextraction of organophosphorous pesticides using nonhalogenated solvents. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 19, p. 2653-2658, 2012. ISSN 1615-9314. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201200241> >.

AMVRAZI, E. G.; MARTINI, M. A.; TSIROPOULOS, N. G. Headspace single-drop microextraction of common pesticide contaminants in honey–method development and comparison with other extraction methods. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 92, n. 4, p. 450-465, 2012/04/15 2011. ISSN 0306-7319. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/03067319.2011.585716> >. Acesso em: 2015/06/17.

AMVRAZI, E. G.; PAPADI-PSYLLOU, A. T.; TSIROPOULOS, N. G. Pesticide enrichment factors and matrix effects on the determination of multiclass pesticides in tomato samples by single-drop microextraction (SDME) coupled with gas chromatography and comparison study between SDME and acetone-partition extraction procedure. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 90, n. 3-6, p. 245-259, 2010/03/15 2010. ISSN 0306-7319. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/03067310903166699> >. Acesso em: 2015/06/17.

AMVRAZI, E. G.; TSIROPOULOS, N. G. Application of single-drop microextraction coupled with gas chromatography for the determination of multiclass pesticides in vegetables with nitrogen phosphorus and electron capture detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 14, p. 2789-2797, 2009a. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967308012673> >.

AMVRAZI, E. G.; TSIROPOULOS, N. G. Chemometric study and optimization of extraction parameters in single-drop microextraction for the determination of multiclass pesticide residues in grapes and apples by gas chromatography mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 45, p. 7630-7638, 2009b. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196730901334X> >.

ANDERSEN, S.; HALVORSEN, T. G.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis, a promising tool for the determination of chiral drugs in biological matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 963, n. 1-2, p. 303-312, 2002. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967302002236> >.

ANDRADE, P. D.; GOMES DA SILVA, J. L.; CALDAS, E. D. Simultaneous analysis of aflatoxins BI, B2, G-1, G2, M-1 and ochratoxin A in breast milk by high-performance liquid chromatography/fluorescence after liquid-liquid extraction with low temperature purification (LLE-LTP). **Journal of Chromatography A**, v. 1304, p. 61-68, Aug 23 2013. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000323017500008 >.

ANTEP, H. M.; MERDIVAN, M. Development of new dispersive liquid-liquid microextraction technique for the identification of zearalenone in beer. **Analytical Methods**, v. 4, n. 12, p. 4129-4134, 2012. ISSN 1759-9660. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C2AY25665G> >.

ARROYO-MANZANARES, N.; GÁMIZ-GRACIA, L.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. Determination of ochratoxin A in wines by capillary liquid chromatography with laser induced fluorescence detection using dispersive liquid-liquid microextraction. **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p. 368-372, 2012. ISSN 03088146.

ARROYO-MANZANARES, N.; GARCÍA-CAMPAÑA, A.; GÁMIZ-GRACIA, L. Comparison of different sample treatments for the analysis of ochratoxin A in wine by capillary HPLC with laser-induced fluorescence detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 9, p. 2987-2994, 2011/11/01 2011. ISSN 1618-2642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-011-5387-3> >.

ARROYO-MANZANARES, N.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; GÁMIZ-GRACIA, L. Multiclass mycotoxin analysis in *Silybum marianum* by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a procedure based on QuEChERS and dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1282, p. 11-19, 2013. ISSN 00219673.

ARROYO-MANZANARES, N.; HUERTAS-PÉREZ, J. F.; GÁMIZ-GRACIA, L.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. A new approach in sample treatment combined with UHPLC-MS/MS for the determination of multiclass mycotoxins in edible nuts and seeds. **Talanta**, v. 115, p. 61-67, 2013. ISSN 00399140.

ASADOLLAHI, T.; DADFARNIA, S.; SHABANI, A. M. H. Separation/preconcentration and determination of vanadium with dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic drop (DLLME-SFO) and electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 82, n. 1, p. 208-212, 2010. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914010002778> >.

ASENSIO-RAMOS, M.; RAVELO-PÉREZ, L. M.; GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á.; HERNÁNDEZ-BORGES, J. Liquid phase microextraction applications in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 42, p. 7415-7437, 2011. ISSN 00219673.

BAN, T.; KAWAIZUMI, F.; NII, S.; TAKAHASHI, K. Study of drop coalescence behavior for liquid-liquid extraction operation. **Chemical Engineering Science**, v. 55, n. 22, p. 5385-5391, Nov 2000. ISSN 0009-2509. Disponível em: <<Go to ISI>://000165318800016 >.

BARAHONA, F.; GJELSTAD, A.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Hollow fiber-liquid-phase microextraction of fungicides from orange juices. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 13, p. 1989-1994, 2010. ISSN 0021-9673. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967310001536> >.

BASHEER, C.; BALASUBRAMANIAN, R.; LEE, H. K. Determination of organic micropollutants in rainwater using hollow fiber membrane/liquid-phase microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1016, n. 1, p. 11-20, 2003. ISSN 0021-9673. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967303012950> >.

BEDENDO, G. C.; CARASEK, E. Simultaneous liquid–liquid microextraction and polypropylene microporous membrane solid-phase extraction of organochlorine pesticides in water, tomato and strawberry samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 1, p. 7-13, 2010. ISSN 0021-9673. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967309016550> >.

BEDENDO, G. C.; JARDIM, I. C. S. F.; CARASEK, E. A simple hollow fiber renewal liquid membrane extraction method for analysis of sulfonamides in honey samples with determination by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 42, p. 6449-6454, 2010. ISSN 0021-9673. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967310011015> >.

BELTRÁN, E.; IBÁÑEZ, M.; PORTOLÉS, T.; RIPOLLÉS, C.; SANCHO, J. V.; YUSÀ, V.; MARÍN, S.; HERNÁNDEZ, F. Development of sensitive and rapid analytical methodology for food analysis of 18 mycotoxins included in a total diet study. **Analytica Chimica Acta**, v. 783, n. 0, p. 39-48, 2013. ISSN 0003-2670. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267013005862> >.

BEN-HANDER, G. M.; MAKAHLEH, A.; SAAD, B.; SALEH, M. I.; CHENG, K. W. Sequential hollow-fiber liquid phase microextraction for the determination of rosiglitazone and metformin hydrochloride (anti-

diabetic drugs) in biological fluids. **Talanta**, v. 131, n. 0, p. 590-596, 2015. ISSN 0039-9140. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914014007073> >.

BERIJANI, S.; ASSADI, Y.; ANBIA, M.; MILANI HOSSEINI, M.-R.; AGHAEI, E. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography–flame photometric detection: Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1123, n. 1, p. 1-9, 2006. ISSN 0021-9673. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967306009411> >.

BIPARVA, P.; EHSANI, M.; HADJMOHAMMADI, M. R. Dispersive liquid–liquid microextraction using extraction solvents lighter than water combined with high performance liquid chromatography for determination of synthetic antioxidants in fruit juice samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 27, n. 1, p. 87-94, 2012. ISSN 0889-1575. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157512000737> >.

BOLAÑOS, P. P.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M. Application of hollow fibre liquid phase microextraction for the multiresidue determination of pesticides in alcoholic beverages by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1208, n. 1–2, p. 16-24, 2008. ISSN 0021-9673. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967308014118> >.

BOONCHIANGMA, S.; NGEONTAE, W.; SRIJARANAI, S. Determination of six pyrethroid insecticides in fruit juice samples using dispersive liquid–liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 88, n. 0, p. 209-215, 2012. ISSN 0039-9140. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914011009350> >.

CAMPILLO, N.; VIÑAS, P.; FÉREZ-MELGAREJO, G.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography

with diode array detection and atmospheric pressure chemical ionization ion-trap tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1282, n. 0, p. 20-26, 2013a. ISSN 0021-9673. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967313002082>>.

CAMPILLO, N.; VIÑAS, P.; FÉREZ-MELGAREJO, G.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Tandem Mass Spectrometry for the Determination of Neonicotinoid Insecticides in Honey Samples Using Dispersive Liquid–Liquid Microextraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 20, p. 4799-4805, 2013/05/22 2013b. ISSN 0021-8561. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1021/jf400669b>>.

CAMPONE, L.; PICCINELLI, A.; RASTRELLI, L. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the identification and the accurate quantification by isotope dilution assay of Ochratoxin A in wine samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 3, p. 1279-1286, 2011/01/01 2011. ISSN 1618-2642. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1007/s00216-010-4347-7>>.

CAMPONE, L.; PICCINELLI, A. L.; CELANO, R.; RASTRELLI, L. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of aflatoxins B-1, B-2, G(1) and G(2) in cereal products. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 42, p. 7648-7654, Oct 21 2011. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<Go to ISI>://000296037900028 >.

CAMPONE, L.; PICCINELLI, A. L.; CELANO, R.; RASTRELLI, L. pH-controlled dispersive liquid–liquid microextraction for the analysis of ionisable compounds in complex matrices: Case study of ochratoxin A in cereals. **Analytica Chimica Acta**, v. 754, p. 61-66, 2012. ISSN 00032670.

CANO-SANCHO, G.; RAMOS, A. J.; MARÍN, S.; SANCHIS, V. Presence and co-occurrence of aflatoxins, deoxynivalenol, fumonisins and zearalenone in gluten-free and ethnic foods. **Food Control**, v. 26, n. 2, p. 282-286, 2012. ISSN 0956-7135. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512000618>>.

CARASEK, E.; MERIB, J. Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 880, n. 0, p. 8-25, 2015. ISSN 0003-2670. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267015002275> >.

CARLETTO, J. S.; LUCIANO, R. M.; BEDENDO, G. C.; CARASEK, E. Simple hollow fiber renewal liquid membrane extraction method for pre-concentration of Cd(II) in environmental samples and detection by Flame Atomic Absorption Spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 638, n. 1, p. 45-50, 2009. ISSN 0003-2670. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267009002736> >.

CHAN, D.; MACDONALD, S. J.; BOUGHTFLOWER, V.; BRERETON, P. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in food using a fully automated immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography–fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1059, n. 1–2, p. 13-16, 2004. ISSN 0021-9673. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967304018242> >.

CHEN, L.; YIN, L.; SONG, F.; LIU, Z.; ZHENG, Z.; XING, J.; LIU, S. Determination of pesticide residues in ginseng by dispersive liquid–liquid microextraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 917–918, n. 0, p. 71-77, 2013. ISSN 1570-0232. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023213000184> >.

CHENG, J.; XIA, Y.; ZHOU, Y.; GUO, F.; CHEN, G. Application of an ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction method for the analysis of diethofencarb and pyrimethanil fungicides in water and fruit juice samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 701, n. 1, p. 86-91, 2011. ISSN 0003-2670. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267011006131> >.

CHO, S.-H.; LEE, C.-H.; JANG, M.-R.; SON, Y.-W.; LEE, S.-M.; CHOI, I.-S.; KIM, S.-H.; KIM, D.-B. Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. **Food Chemistry**, v.

107, n. 3, p. 1283-1288, Apr 1 2008. ISSN 0308-8146. Disponível em: <[Go to ISI](#)>://WOS:000252004100042 >.

DASHTBOZORGI, Z.; RAMEZANI, M. K.; WAQIF-HUSAIN, S. Optimization and validation of a new pesticide residue method for cucumber and tomato using acetonitrile-based extraction-dispersive liquid-liquid microextraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 5, n. 5, p. 1192-1198, 2013. ISSN 1759-9660. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C2AY26287H> >.

DE OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. D. S.; DE SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. Liquid-phase microextraction (LPME): Fundamentals and applications to the analysis of drugs in biological samples. **Quimica Nova**, v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-45849129738&partnerID=40&md5=6004479725b3b175a5e1d43d5a07ea20> >.

DOS ANJOS, J. P.; DE ANDRADE, J. B. Determination of nineteen pesticides residues (organophosphates, organochlorine, pyrethroids, carbamate, thiocarbamate and strobilurin) in coconut water by SDME/GC-MS. **Microchemical Journal**, v. 112, n. 0, p. 119-126, 2014. ISSN 0026-265X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X13001811> >.

DOS ANJOS, J. P.; DE ANDRADE, J. B. Simultaneous determination of pesticide multiresidues in white wine and rosé wine by SDME/GC-MS. **Microchemical Journal**, v. 120, n. 0, p. 69-76, 2015. ISSN 0026-265X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X15000119> >.

ESRAFILI, A.; YAMINI, Y.; SHARIATI, S. Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of some antidepressant drugs in biological fluids. **Analytica Chimica Acta**, v. 604, n. 2, p. 127-133, 2007. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267007017151> >.

FARAJZADEH, M.; BAHRAM, M.; VARDAST, M.; BAMOROWAT, M. Dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of three organophosphorus pesticides in real samples by high performance liquid chromatography-ultraviolet detection and its optimization by experimental design. **Microchimica Acta**, v. 172, n. 3-4, p. 465-470, 2011/03/01 2011. ISSN 0026-3672. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00604-010-0451-9> >.

FARAJZADEH, M. A.; DJOZAN, D.; KHORRAM, P. Development of a new dispersive liquid-liquid microextraction method in a narrow-bore tube for preconcentration of triazole pesticides from aqueous samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 713, n. 0, p. 70-78, 2012. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326701101511X> >.

FARAJZADEH, M. A.; MOGADDAM, M. R. A.; GHORBANPOUR, H. Development of a new microextraction method based on elevated temperature dispersive liquid-liquid microextraction for determination of triazole pesticides residues in honey by gas chromatography-nitrogen phosphorus detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1347, n. 0, p. 8-16, 2014. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967314006578> >.

FARHADI, K.; MALEKI, R. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-DAD as an efficient and sensitive technique for the determination of patulin from apple juice and concentrate samples. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 58, n. 3, p. 340-345, 2011. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80051581781&partnerID=40&md5=70a585d465f2cff5c092f0e022462d92> >.

FONTANA, A. R.; WUILLOUD, R. G.; MARTÍNEZ, L. D.; ALTAMIRANO, J. C. Simple approach based on ultrasound-assisted emulsification-microextraction for determination of polibrominated flame retardants in water samples by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 1, p. 147-153, 2009. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196730802013X> >.

FU, L.; LIU, X.; HU, J.; ZHAO, X.; WANG, H.; WANG, X. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of triazophos and carbaryl pesticides in water and fruit juice samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, n. 2, p. 289-295, 2009. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267008019235> >.

GAO, S.; YOU, J.; ZHENG, X.; WANG, Y.; REN, R.; ZHANG, R.; BAI, Y.; ZHANG, H. Determination of phenylurea and triazine herbicides in milk by microwave assisted ionic liquid microextraction high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 82, n. 4, p. 1371-1377, 2010. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914010005163> >.

GARBI, A.; SAKKAS, V.; FIAMEGOS, Y. C.; STALIKAS, C. D.; ALBANIS, T. Sensitive determination of pesticides residues in wine samples with the aid of single-drop microextraction and response surface methodology. **Talanta**, v. 82, n. 4, p. 1286-1291, 2010. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914010004923> >.

GARCIA-VILLANOVA, R. J.; CORDON, C.; PARAMAS, A. M. G.; APARICIO, P.; ROSALES, M. E. G. Simultaneous immunoaffinity column cleanup and HPLC analysis of aflatoxins and ochratoxin A in Spanish bee pollen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 24, p. 7235-7239, Dec 1 2004. ISSN 0021-8561. Disponível em: <Go to ISI>://000225358900007 >.

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. ISSN 0026-3672

1436-5073.

GILBERT, J.; ANKLAM, E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. **Trac-Trends in Analytical**

Chemistry, v. 21, n. 6-7, p. 468-486, Jun-Jul 2002. ISSN 0165-9936.
Disponível em: <<Go to ISI>://000176958600017 >.

GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; LEACHE, C.; VISCARRET, M.; PÉREZ DE OBANOS, A.; ARAGUÁS, C.; LÓPEZ DE CERAIN, A. Determination of ochratoxin A in wine using liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, n. 2, p. 163-168, 2004. ISSN 00219673.

GUTIÉRREZ VALENCIA, T. M.; GARCÍA DE LLASERA, M. P. Determination of organophosphorus pesticides in bovine tissue by an on-line coupled matrix solid-phase dispersion–solid phase extraction–high performance liquid chromatography with diode array detection method. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 39, p. 6869-6877, 2011. ISSN 0021-9673. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967311011769> >.

HALVORSEN, T. G.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Reduction of extraction times in liquid-phase microextraction. **Journal of Chromatography B**, v. 760, n. 2, p. 219-226, Sep 5 2001. ISSN 0378-4347. Disponível em: <<Go to ISI>://000170469500004 >.

HAN, D.; ROW, K. Trends in liquid-phase microextraction, and its application to environmental and biological samples. **Microchimica Acta**, v. 176, n. 1-2, p. 1-22, 2012/01/01 2012. ISSN 0026-3672. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1007/s00604-011-0678-0> >.

HE, L.; LUO, X.; JIANG, X.; QU, L. A new 1,3-dibutylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction to determine organophosphorus pesticides in water and fruit samples by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 31, p. 5013-5020, 2010. ISSN 0021-9673. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967310007296> >.

HERRERA-HERRERA, A. V.; ASENSIO-RAMOS, M.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. Á. Dispersive liquid-liquid

microextraction for determination of organic analytes. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 728-751, 2010. ISSN 0165-9936.

Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993610001391> >.

Acesso em: 2010/8//.

HO, T. S.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction - Comparison with conventional liquid-liquid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 963, n. 1-2, p. 3-17, Jul 19 2002. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<Go to ISI>://000177144300002 >.

HO, Y. H.; WU, H. L.; WU, S. M.; CHEN, S. H.; KOU, H. S. Quantitative enantiomeric analysis of chlorcyclizine, hydroxyzine, and meclizine by capillary electrophoresis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, n. 6, p. 859-863, Jul 2003. ISSN 1618-2642. Disponível em: <<Go to ISI>://000184095700016 >.

HU, Y.; WANG, Y.; HU, Y.; LI, G. Liquid-liquid-solid microextraction based on membrane-protected molecularly imprinted polymer fiber for trace analysis of triazines in complex aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 47, p. 8304-8311, 2009. ISSN 0021-9673. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967309014502> >.

IMPERATO, R.; CAMPONE, L.; PICCINELLI, A. L.; VENEZIANO, A.; RASTRELLI, L. Survey of aflatoxins and ochratoxin a contamination in food products imported in Italy. **Food Control**, v. 22, n. 12, p. 1905-1910, 2011. ISSN 0956-7135. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713511001861> >.

JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Solvent microextraction into a single drop. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 13, p. 2236-2240, Jul 1 1996. ISSN 0003-2700. Disponível em: <<Go to ISI>://A1996UW36700042 >.

JIA, C. H.; ZHU, X. D.; CHEN, L.; HE, M.; YU, P. Z.; ZHAO, E. C. Extraction of organophosphorus pesticides in water and juice using

ultrasound-assisted emulsification-microextraction. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 2, p. 244-250, Feb 2010. ISSN 1615-9306. Disponível em: <<Go to ISI>://000274578000015 >.

JOVANOVIĆ, P.; GUZSVÁNYI, V.; FRANKO, M.; LAZIĆ, S.; SAKAČ, M.; ŠARIĆ, B.; BANJAC, V. Multi-residue method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey using optimized dispersive liquid-liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 111, n. 0, p. 125-133, 2013. ISSN 0039-9140. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914013001331> >.

KARAMI-OSBOO, R.; MAHAM, M.; MIRI, R.; ALIABADI, M.; MIRABOLFATHY, M.; JAVIDNIA, K. Evaluation of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction-HPLC-UV for Determination of Deoxynivalenol (DON) in Wheat Flour. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 1, p. 176-180, 2013/02/01 2013. ISSN 1936-9751. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1007/s12161-012-9428-0> >.

KHALILI ZANJANI, M. R.; YAMINI, Y.; SHARIATI, S.; JÖNSSON, J. Å. A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop. **Analytica Chimica Acta**, v. 585, n. 2, p. 286-293, 2007. ISSN 0003-2670. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267007000037> >.

KOU, D.; MITRA, S. Simultaneous extraction and concentration by on-line hollow fiber membrane extraction. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 22, p. 6355-6360, Nov 15 2003. ISSN 0003-2700. Disponível em: <<Go to ISI>://000186601500045 >.

LAI, X.-W.; SUN, D.-L.; RUAN, C.-Q.; ZHANG, H.; LIU, C.-L. Rapid analysis of aflatoxins B1, B2, and ochratoxin A in rice samples using dispersive liquid-liquid microextraction combined with HPLC. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 1-2, p. 92-98, 2014a. ISSN 16159306.

LAI, X.-W.; SUN, D.-L.; RUAN, C.-Q.; ZHANG, H.; LIU, C.-L. Rapid analysis of aflatoxins B-1, B-2, and ochratoxin A in rice samples using

dispersive liquid-liquid microextraction combined with HPLC. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 1-2, p. 92-98, Jan 2014b. ISSN 1615-9306. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000329478100014 >.

LEE, J.; LEE, H. K.; RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 624, n. 2, p. 253-268, 2008. ISSN 00032670.

LEONG, M.-I.; FUH, M.-R.; HUANG, S.-D. Beyond dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1335, n. 0, p. 2-14, 2014. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967314002374> >.

LI, S.; LI, Y.; WANG, Y.; ZHOU, W.; GAO, H.; ZHANG, S. Water-based slow injection ultrasound-assisted emulsification microextraction for the determination of deoxynivalenol and de-epoxy-deoxynivalenol in maize and pork samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 12, p. 4307-4311, 2013/05/01 2013. ISSN 1618-2642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-013-6792-6> >.

LIANG, P.; LIU, G.; WANG, F.; WANG, W. Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction with solidification of floating organic droplet followed by high performance liquid chromatography for the determination of strobilurin fungicides in fruit juice samples. **Journal of Chromatography B**, v. 926, n. 0, p. 62-67, 2013. ISSN 1570-0232. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023213001074> >.

LIN, X.; CHEN, X.; HUO, X.; YU, Z.; BI, K.; LI, Q. Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-diode array detection for the determination of N-methyl carbamate pesticides in vegetables. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 2, p. 202-209, 2011. ISSN 1615-9314. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201000590> >.

LIU, J.-F.; JIANG, G.-B.; JÖNSSON, J. Å. Application of ionic liquids in analytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 1, p. 20-27, 2005. ISSN 0165-9936. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993604030614>>.

LIU, Z.; LIU, W.; RAO, H.; FENG, T.; LI, C.; WANG, C.; WANG, Z. Determination of some carbamate pesticides in watermelon and tomato samples by dispersive liquid–liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 92, n. 5, p. 571-581, 2012/04/20 2012. ISSN 0306-7319. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1080/03067311003628638>>. Acesso em: 2015/06/18.

LIU, Z.; LIU, W.; WU, Q.; ZANG, X.; ZHOU, X.; ZENG, X.; WANG, Z. Determination of carbendazim and thiabendazole in apple juice by hollow fibre-based liquid phase microextraction-high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 92, n. 5, p. 582-591, 2012/04/20 2011. ISSN 0306-7319. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1080/03067311003628646>>. Acesso em: 2015/06/15.

MELO, A.; MANSILHA, C.; PINHO, O.; M.P.L.V.O. FERREIRA, I. Analysis of Pesticides in Tomato Combining QuEChERS and Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Followed by High-Performance Liquid Chromatography. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 2, p. 559-568, 2013/04/01 2013. ISSN 1936-9751. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1007/s12161-012-9469-4>>.

MOINFAR, S.; HOSSEINI, M. R. M. Development of dispersive liquid-liquid microextraction method for the analysis of organophosphorus pesticides in tea. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, n. 1-3, p. 907-911, 2009. Disponível em: <
<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-67649792018&partnerID=40&md5=482e358af84746e41a6ea965666cadca>>.

MORENO-GONZÁLEZ, D.; GÁMIZ-GRACIA, L.; GARCÍA-CAMPAÑA, A.; BOSQUE-SENDRA, J. Use of dispersive liquid–liquid

microextraction for the determination of carbamates in juice samples by sweeping-micellar electrokinetic chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 5, p. 1329-1338, 2011/05/01 2011. ISSN 1618-2642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-011-4682-3> >.

OLIVEIRA, C. A. F.; SEBASTIAO, L. S.; FAGUNDES, H.; ROSIM, R. E.; FERNANDES, A. M. Aflatoxins and cyclopiazonic acid in feed and milk from dairy farms in Sao Paulo, Brazil. **Food Additives & Contaminants Part B-Surveillance**, v. 1, n. 2, p. 147-152, Dec 2008. ISSN 1939-3210. Disponível em: < <Go to ISI>://000262818300010 >.

OZBEY, F.; KABAK, B. Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices. **Food Control**, v. 28, n. 2, p. 354-361, 2012. ISSN 0956-7135. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512002629> >.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-Liquid-Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 14, p. 2650-2656, 1999/07/01 1999. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ac990055n> >.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction and capillary electrophoresis of acidic drugs. **Electrophoresis**, v. 21, n. 3, p. 579-585, 2000. ISSN 1522-2683. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000201\)21:3<579::AID-ELPS579>3.0.CO;2-E](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000201)21:3<579::AID-ELPS579>3.0.CO;2-E) >.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction utilising plant oils as intermediate extraction medium - Towards elimination of synthetic organic solvents in sample preparation. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 17-18, p. 1511-1516, Dec 2004. ISSN 1615-9306. Disponível em: < <Go to ISI>://000225938100015 >.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: New concept for rapid sample

preparation of biological fluids. **Journal of Chromatography A**, v. 1109, n. 2, p. 183-190, 2006. ISSN 0021-9673. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967306001373> >.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1-2, p. 132-142, Mar 14 2008. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<Go to ISI>://000254429600015 >.

PENA-PEREIRA, F.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 64, n. 1, p. 1-15, 2009. ISSN 0584-8547. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0584854708003431> >.

PEREIRA, V. L.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 36, n. 2, p. 96-136, Apr 2014. ISSN 0924-2244. Disponível em: <<Go to ISI>://000335632300003 >.

PRELLE, A.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices commercialized in Italy. **Food Control**, v. 39, n. 0, p. 192-197, 2014. ISSN 0956-7135. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713513005872> >.

PROSEN, H. Applications of Liquid-Phase Microextraction in the Sample Preparation of Environmental Solid Samples. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6776, 2014. ISSN 1420-3049. Disponível em: <
<http://www.mdpi.com/1420-3049/19/5/6776> >.

PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 9, p.

565-574, 2003. ISSN 0165-9936. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993603010070>>.

QIAO, F.; ZHANG, X.; WANG, M.; KANG, Y. Rapid Extraction of Imidacloprid in Tomatoes by Ultrasonic Dispersion Liquid–Liquid Microextraction Coupled with LC Determination. **Chromatographia**, v. 72, n. 3-4, p. 331-335, 2010/08/01 2010. ISSN 0009-5893. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1365/s10337-010-1661-3> >.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Methods of extraction and/or concentration of compounds found in biological fluids for subsequent chromatographic determination. **Quimica Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, Jan-Feb 2001. ISSN 0100-4042. Disponível em: < <Go to ISI>://000167056900013 >.

QUINTO, M.; SPADACCINO, G.; PALERMO, C.; CENTONZE, D. Determination of aflatoxins in cereal flours by solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography and post-column photochemical derivatization-fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 49, p. 8636-8641, Dec 4 2009. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://000272089200010 >.

RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 1-10, Jan 2004. ISSN 0165-9936. Disponível em: < <Go to ISI>://000188601100011 >.

RAVELO-PÉREZ, L.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; HERRERA-HERRERA, A.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. Pesticide extraction from table grapes and plums using ionic liquid based dispersive liquid–liquid microextraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 7, p. 2387-2395, 2009/12/01 2009a. ISSN 1618-2642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-009-3133-x> >.

RAVELO-PÉREZ, L. M.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; ASENSIO-RAMOS, M.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. Á. Ionic liquid based dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of pesticides

from bananas. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 43, p. 7336-7345, 2009b. ISSN 0021-9673. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967309011960>>.

REN, Y.; ZHANG, Y.; SHAO, S.; CAI, Z.; FENG, L.; PAN, H.; WANG, Z. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1143, n. 1-2, p. 48-64, 2007. ISSN 0021-9673. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967306023880>>.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINIA, M. R. M.; AGHAEI, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1-2, p. 1-9, May 26 2006. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<Go to ISI>://000237680300001 >.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2342-2357, Apr 16 2010. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<Go to ISI>://000276567100009 >.

RIDGWAY, K.; LALLJIE, S. P. D.; SMITH, R. M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, n. 1-2, p. 36-53, 2007. ISSN 00219673.

ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M.; AGUILERA-LUIZ, M. M. Determination of ochratoxin A and T-2 toxin in alcoholic beverages by hollow fiber liquid phase microextraction and ultra high-pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 82, n. 1, p. 171-176, 2010. ISSN 00399140.

ROMERO-GONZÁLEZ, R.; PASTOR-MONTORO, E.; MARTÍNEZ-VIDAL, J. L.; GARRIDO-FRENICH, A. Application of hollow fiber supported liquid membrane extraction to the simultaneous determination of pesticide residues in vegetables by liquid chromatography/mass

spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 18, p. 2701-2708, 2006. ISSN 1097-0231. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1002/rcm.2653> >.

SEEBUNRUENG, K.; SANTALADCHAIYAKIT, Y.; SRIJARANAI, S. Vortex-assisted low density solvent liquid-liquid microextraction and salt-induced demulsification coupled to high performance liquid chromatography for the determination of five organophosphorus pesticide residues in fruits. **Talanta**, v. 132, n. 0, p. 769-774, 2015. ISSN 0039-9140. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914014008480> >.

ŞENYUVA, H. Z.; GILBERT, J. Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 2, p. 115-132, 2010. ISSN 1570-0232. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S157002320900378X> >.

SHEN, G.; LEE, H. K. Hollow Fiber-Protected Liquid-Phase Microextraction of Triazine Herbicides. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 3, p. 648-654, 2002/02/01 2002. ISSN 0003-2700. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1021/ac010561o> >.

SIRHAN, A. Y.; TAN, G. H.; WONG, R. C. S. Determination of aflatoxins in food using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time of flight mass spectrometry (LC-ESI-QTOF-MS/MS). **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 35-44, 2013. ISSN 0956-7135. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512005038> >.

TANKEVICIUTE, A.; KAZLAUSKAS, R.; VICKACKAITE, V. Headspace extraction of alcohols into a single drop. **Analyst**, v. 126, n. 10, p. 1674-1677, 2001. ISSN 0003-2654. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1039/B103493F> >.

TOMASINI, D.; SAMPAIO, M. R. F.; CARDOSO, L. V.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Comparison of dispersive liquid-liquid microextraction and the modified QuEChERS method for the determination of fipronil in honey

by high performance liquid chromatography with diode-array detection. **Analytical Methods**, v. 3, n. 8, p. 1893-1900, 2011. ISSN 1759-9660. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C1AY05221G> >.

TRUCKSESS, M.; WEAVER, C.; OLES, C.; D'OVIDIO, K.; RADER, J. Determination of aflatoxins and ochratoxin A in ginseng and other botanical roots by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Aoac International**, v. 89, n. 3, p. 624-630, May-Jun 2006. ISSN 1060-3271. Disponível em: < Go to ISI://000237980100006 >.

TSIROPOULOS, N. G.; AMVRAZI, E. G. Determination of pesticide residues in honey by single-drop microextraction and gas chromatography. **Journal of Aoac International**, v. 94, n. 2, p. 634-644, 2011. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79953681595&partnerID=40&md5=ed34bb9ab141d1f6ce14450470a9b7f0> >.

UGLAND, H. G.; KROGH, M.; REUBSAET, L. Three-phase liquid-phase microextraction of weakly basic drugs from whole blood. **Journal of Chromatography B**, v. 798, n. 1, p. 127-135, 2003. ISSN 1570-0232. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023203007499> >.

ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 902, n. 1, p. 167-194, 2000. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967300009341> >.

VICHAPONG, J.; BURAKHAM, R. Novel ultrasound-assisted mixed anionic-cationic surfactant-enhanced emulsification microextraction combined with HPLC for the determination of carbamate pesticides. **Analytical Methods**, v. 4, n. 7, p. 2101-2108, 2012. ISSN 1759-9660. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C2AY25139F> >.

VÍCTOR-ORTEGA, M. D.; LARA, F. J.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; DEL OLMO-IRUELA, M. Evaluation of dispersive liquid-liquid

microextraction for the determination of patulin in apple juices using micellar electrokinetic capillary chromatography. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 353-358, 2013. ISSN 0956-7135. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095671351200597X> >.

VIÑAS, P.; CAMPILLO, N.; LÓPEZ-GARCÍA, I.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Dispersive liquid-liquid microextraction in food analysis. A critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 8, p. 2067-2099, 2014/03/01 2014. ISSN 1618-2642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-013-7344-9> >.

WAN AINIZA, W. M.; JINAP, S.; SANNY, M. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in single and mixed spices. **Food Control**, v. 50, n. 0, p. 913-918, 2015. ISSN 0956-7135. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713514006331> >.

WANG, J.; DU, Z.; YU, W.; QU, S. Detection of seven pesticides in cucumbers using hollow fibre-based liquid-phase microextraction and ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1247, n. 0, p. 10-17, 2012a. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967312007571> >.

WANG, P.; YANG, X.; WANG, J.; CUI, J.; DONG, A. J.; ZHAO, H. T.; ZHANG, L. W.; WANG, Z. Y.; XU, R. B.; LI, W. J.; ZHANG, Y. C.; ZHANG, H.; JING, J. Multi-residue method for determination of seven neonicotinoid insecticides in grains using dispersive solid-phase extraction and dispersive liquid-liquid micro-extraction by high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1691-1698, 2012b. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612005869> >.

WANG, S.; LIU, C.; YANG, S.; LIU, F. Ionic Liquid-Based Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Following High-Performance Liquid Chromatography for the Determination of Fungicides in Fruit Juices. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 2, p. 481-487, 2013/04/01 2013. ISSN 1936-9751. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-012-9402-x> >.

WANG, S.; REN, L.; XU, Y.; LIU, F. Application of ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction followed high-performance liquid chromatography for the determination of fungicides in red wine. **Microchimica Acta**, v. 173, n. 3-4, p. 453-457, 2011/06/01 2011. ISSN 0026-3672. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00604-011-0577-4> >.

WANG, Y.; CHAI, T.; LU, G.; QUAN, C.; DUAN, H.; YAO, M.; ZUCKER, B.-A.; SCHLENKER, G. Simultaneous detection of airborne Aflatoxin, Ochratoxin and Zearalenone in a poultry house by immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography. **Environmental Research**, v. 107, n. 2, p. 139-144, 2008. ISSN 0013-9351. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935108000212> >.

WANG, Y.; YOU, J.; REN, R.; XIAO, Y.; GAO, S.; ZHANG, H.; YU, A. Determination of triazines in honey by dispersive liquid-liquid microextraction high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 26, p. 4241-4246, 2010. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196731000395X> >.

WU, J.; XIANG, B.; XIA, J. Application of ultrasound-assisted emulsification-microextraction combined with high performance liquid chromatography to the determination of propoxur in environmental and beverage samples. **Microchimica Acta**, v. 166, n. 1-2, p. 157-162, 2009/07/01 2009. ISSN 0026-3672. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00604-009-0179-6> >.

WU, Q.; LI, Z.; WANG, C.; WU, C.; WANG, W.; WANG, Z. Dispersive Solid-Phase Extraction Clean-up Combined with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Determination of Neonicotinoid Insecticides in Vegetable Samples by High-Performance Liquid Chromatography. **Food Analytical Methods**, v. 4, n. 4, p. 559-566, 2011/12/01 2011. ISSN 1936-9751. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-011-9200-x> >.

XIAO, Q.; HU, B.; YU, C.; XIA, L.; JIANG, Z. Optimization of a single-drop microextraction procedure for the determination of organophosphorus pesticides in water and fruit juice with gas chromatography-flame photometric detection. **Talanta**, v. 69, n. 4, p. 848-855, 2006. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914005007563> >.

XIE, F.; LAI, W.; SAINI, J.; SHAN, S.; CUI, X.; LIU, D. Rapid pretreatment and detection of trace aflatoxin B1 in traditional soybean sauce. **Food Chemistry**, v. 150, n. 0, p. 99-105, 2014. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613015963> >.

XIONG, J.; HU, B. Comparison of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of organosulfur pesticides in environmental and beverage samples by gas chromatography with flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1193, n. 1-2, p. 7-18, 2008. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967308005748> >.

ZHANG, J.; GAO, H.; PENG, B.; LI, S.; ZHOU, Z. Comparison of the performance of conventional, temperature-controlled, and ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography in analyzing pyrethroid pesticides in honey samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 38, p. 6621-6629, 2011. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967311011411> >.

ZHANG, L.; CHEN, F.; LIU, S.; CHEN, B.; PAN, C. Ionic liquid-based vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction of organophosphorus pesticides in apple and pear. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 18, p. 2514-2519, 2012a. ISSN 1615-9314. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201101060> >.

ZHANG, S.; LI, C.; SONG, S.; FENG, T.; WANG, C.; WANG, Z. Application of dispersive liquid-liquid microextraction combined with sweeping micellar electrokinetic chromatography for trace analysis of six

carbamate pesticides in apples. **Analytical Methods**, v. 2, n. 1, p. 54-62, 2010. ISSN 1759-9660. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/B9AY00115H> >.

ZHANG, S.; YANG, X.; YIN, X.; WANG, C.; WANG, Z. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with sweeping micellar electrokinetic chromatography for the determination of some neonicotinoid insecticides in cucumber samples. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 544-550, 2012b. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612000611> >.

ZHANG, W. D.; LI, A. M.; LI, X. M.; REN, Z. Q. Principle of liquid membrane and hollow fiber renewal liquid membrane. **Xiandai Huagong/Modern Chemical Industry**, v. 25, n. 4, p. 66-68, 2005. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-20144364381&partnerID=40&md5=a109211de209c8def6e4ab0401e28f58> >.

ZHOU, S.; CHEN, H.; WU, B.; MA, C.; YE, Y. Sensitive determination of carbamates in fruit and vegetables by a combination of solid-phase extraction and dispersive liquid-liquid microextraction prior to HPLC. **Microchimica Acta**, v. 176, n. 3-4, p. 419-427, 2012/02/01 2012. ISSN 0026-3672. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00604-011-0735-8> >.

ZHOU, Y.; HAN, L.; CHENG, J.; GUO, F.; ZHI, X.; HU, H.; CHEN, G. Dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of a floating organic droplet for simultaneous analysis of diethofencarb and pyrimethanil in apple pulp and peel. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 5, p. 1901-1906, 2011/02/01 2011. ISSN 1618-2642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-010-4567-x> >.

ZHU, L. Y.; EE, K. H.; ZHAO, L. M.; LEE, H. K. Analysis of phenoxy herbicides in bovine milk by means of liquid-liquid-liquid microextraction with a hollow-fiber membrane. **Journal of Chromatography A**, v. 963, n. 1-2, p. 335-343, Jul 19 2002. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://000177144300037 >.

ZHU, Z.; LIU, G.; CHEN, Y.; CHENG, J. Assessment of aflatoxins in pigmented rice using a validated immunoaffinity column method with fluorescence HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 31, n. 2, p. 252-258, 2013. ISSN 0889-1575. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S088915751300077X>>.