



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CATALÃO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



VINICIUS EVANGELISTA ARAÚJO

**DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DO FUNGICIDA TIABENDAZOL EXTRAÍDO DE
AMOSTRAS DE SUCO DE UVA INTEGRAL POR PONTO NUVEM COM ELETRODO
DE DIAMANTE DOPADO COM BORO**

**CATALÃO(GO)
2022**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE QUÍMICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Vinicius Evangelista Araújo

3. Título do trabalho

DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DO FUNGICIDA TIABENDAZOL EXTRAÍDO DE AMOSTRAS DE SUCO DE UVA INTEGRAL POR PONTO NUVEM COM ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
- b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;

- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Santos Andrade, Professor do Magistério Superior**, em 17/10/2022, às 10:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **VINICIUS EVANGELISTA ARAUJO, Discente**, em 17/10/2022, às 14:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3246190** e o código CRC **96B251D8**.

VINICIUS EVANGELISTA ARAÚJO

**DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DO FUNGICIDA TIABENDAZOL EXTRAÍDO DE
AMOSTRAS DE SUCO DE UVA INTEGRAL POR PONTO NUVEM COM ELETRODO
DE DIAMANTE DOPADO COM BORO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química, da Universidade Federal de Catalão (UFCAT), como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química.

Linha de Pesquisa: Química dos Materiais.

Orientador: Professor Doutor Leonardo Santos Andrade.

CATALÃO(GO)
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFCAT.

Araújo, Vinicius Evangelista

Detecção eletroquímica do fungicida tiabendazol extraído de amostras de suco de uva integral por ponto nuvem com eletrodo de diamante dopado com boro / Vinicius Evangelista Araújo. - 2022. 103, XXII f.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Santos Andrade.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Catalão, Instituto de Química, Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química, Catalão, 2022.

Anexos.

Inclui abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Detecção eletroquímica. 2. Eletrodo de Diamante dopado com boro. 3. Extração por Ponto Nuvem. 4. Agrotóxico. 5. Suco de uva integral. I. Andrade, Leonardo Santos , orient. II. Título.

CDU 54



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE QUÍMICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 19 da sessão de Defesa de Dissertação de **Vinicius Evangelista Araújo**, que confere o título de Mestre em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química da UFCAT.

Aos cinco dias do mês de outubro de dois mil e vinte e dois, a partir das 14:00 horas, por videoconferência do google meet, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “**DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DO FUNGICIDA TIABENDAZOL EXTRAÍDO DE AMOSTRAS DE SUCO DE UVA INTEGRAL POR PONTO NUVEM COM ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO**” na área de concentração em Química. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor Leonardo Santos Andrade (PPGQ | UFCAT) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Doutora Kamila Pereira de Amorim, membro titular externo; Professor Doutor Gildiberto Mendonça de Oliveira (UFJ), membro titular externo cujas participações ocorreram por meio de videoconferência pelo link <https://meet.google.com/ypa-pgui-efk>. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestões de pequenas alterações e complementações no trabalho final. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor Leonardo Santos Andrade, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Não houve alteração no título



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Santos Andrade, Professor do Magistério Superior**, em 06/10/2022, às 08:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **KAMILA PEREIRA DE AMORIM, Usuário Externo**, em 06/10/2022, às 09:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gildiberto Mendonça de Oliveira, Usuário Externo**, em 06/10/2022, às 10:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3236240** e o código CRC **78FAD9CD**.

Referência: Processo nº 23070.054452/2022-05

SEI nº 3236240

NOTA

Os Programas de Pós-Graduação *stricto sensu* em funcionamento na Universidade Federal de Catalão (UFCAT), em virtude de procedimentos técnicos relacionados à CAPES, continuam provisoriamente vinculados à Universidade Federal de Goiás (UFG), por isso, todos os elementos pré-textuais do trabalho apresentado estão identificados como Universidade Federal de Goiás/Universidade Federal de Catalão em implantação, em função da migração da BDTD ter ocorrido a partir de 16 de agosto de 2021, assim como pelo fato das pesquisas e produtos serem realizados na UFCAT.

Se correr o bicho pega,
Se ficar o bicho come,
Mas se unir o bicho foge!

Mario Sergio Cortela

Dedico este trabalho aos gigantes que me deram os ombros para subir:

dedico aos meus pais...

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeira e especialmente aos meus pais, Flávio e Yara, que, durante todo meu desenvolvimento pessoal, profissional e acadêmico, me instruíram, apoiaram e deram espaço para buscar o máximo do meu potencial. A combinação disso e de todo amor envolvido me faz tentar ser cada vez maior e melhor a todo momento, comigo e com os outros. A missão de me dedicar à partilha de conhecimento, em grande parte, foi espelhada em vocês.

Agradeço aos meus irmãos, Bianca e Gustavo, que a todo momento estiveram por perto, como amigos, como apoio, como interferentes (positivos), independente do quão caótica as situações fossem. A prática de construção e desconstrução com a existência e presença de vocês é bem melhor.

Agradeço à minha avó Delair, que, desde o momento em que foi possível dividir o mesmo teto, me proporcionou inúmeros momentos de reflexão, aprendizado e felicidade, os quais só o tempo vai me fazer absorver melhor. Aprendi a ver o mundo e as etapas da vida de forma diferente com você em nossa casa.

Agradeço à namorada, Halina, por todo apoio, companheirismo, pela compaixão e força que me deu durante este processo. Você me ajudou/ajuda e muito em cada passo que dou. Então, é com grande carinho que dedico este espaço a você.

Agradeço aos amigos, Higor, Gabriel, Victor e Yuri, os que constantemente agradeço pela paciência e amizade de tanto tempo. Grande parte do meu desenvolvimento pessoal tem participação de vocês, principalmente por se fazerem sempre presentes.

Agradeço à relação de parceria desenvolvida com as/os colegas de laboratório, construída dentro e fora dele. Em especial, gostaria de destacar a Alexia e a Gabriela. Alexia, que me acompanhou e ajudou desde o momento em que entrei na pós-graduação como aluno especial, e tenho hoje como amiga. Gabriela, que, além de me aconselhar durante o processo experimental, foi essencial no meu crescimento investigativo, se fazendo presente a todo momento. Sua amizade também foi essencial.

Agradeço aos professores, Leonardo, Mário, Maria Fernanda, Maria Zenaide e Vanessa, que, além de todo o trabalho desenvolvido na graduação, se estenderam pela pós-graduação com

um exímio exercício da profissão, sendo essenciais no aprofundamento dos conhecimentos da ciência Química e do processo de ensino-aprendizagem. Destaco aqui o professor Leonardo, que me acompanhou em inúmeras disciplinas da graduação, e aceitou a tarefa de me orientar, possibilitando a construção de uma parceria durante a pós-graduação. Sua orientação e transmissão de conhecimento foi e é característica elementar.

Dedico este parágrafo em separado para agradecer aos membros da minha banca de qualificação, Kamilla e Vanessa, e da banca de defesa, Gildiberto e Kamilla, que contribuíram grandemente, em suas devidas etapas, para a resolução final do trabalho de Mestrado, tanto na parte operacional quanto no texto. Foi uma excelente experiência fazer parte de um processo tendo-os como examinadores, levando-me a aprofundar ainda mais no trabalho proposto.

Agradeço especialmente aos meus tios Léa e Francisco, por toda dedicação e todo esforço na análise e correção do texto da Dissertação. Como excelentes corretores, tiveram uma parcela muito importante na resolução final deste trabalho, pois, além de contribuírem na discussão da escrita geral do texto, permitiram que ele seja finalizado da forma que eu tanto queria: com cuidado e carinho ao leitor e todos àqueles que foram citados.

Agradeço a existência da universidade pública, em especial à Universidade Federal de Catalão e ao Instituto de Química da UFCAT, os quais proporcionaram o espaço e o momento para meu aprimoramento pessoal e acadêmico, que foi catalisador da mudança em minha vida, assim como de tantas outras. A época não é favorável, mas a sua presença transcende e deve continuar transcendendo as barreiras físicas. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que proporcionou o subsídio para o desenvolvimento do meu projeto de pesquisa.

RESUMO

O suco de uva integral, no Brasil e no mundo, vem ganhando destaque ao longo dos anos por representar uma excelente opção ao vinho, por sua proveniência e em termos de substâncias com potencial antioxidante, ainda podendo ser consumido de forma mais ampla pela população. O aumento do consumo exige maior capacidade produtiva e, portanto, da melhoria de técnicas de manejo e extensa utilização de intensivos agrícolas, como os agrotóxicos. Uma vez que a ingestão destas substâncias em alimentos prevê diversos tipos de intoxicação, agudas ou crônicas, as técnicas com potencial de determinação e detecção delas surgem como medida de controle de qualidade. Nesse sentido, a metodologia proposta neste trabalho tem como objetivo detectar e determinar o fungicida Tiabendazol (TBZ) em suco de uva integral branco, combinando a Extração por Ponto Nuvem (EPN) com Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada à detecção eletroquímica pelo uso de um eletrodo de Diamante Dopado com Boro (DDB). Em vista disso, utilizou-se as técnicas de Voltametria Cíclica e de Pulso Diferencial para caracterização eletroquímica do TBZ e seu comportamento na superfície do eletrodo de trabalho. A partir destas técnicas foi possível selecionar a melhor condição de pH para fase móvel (7,0), respeitando-se os limites de uso da coluna cromatográfica. As melhores condições para extração e pré concentração do TBZ apontaram para uma EPN realizada em pH 6,0, pela adição de 1mL do surfactante Tergitol TMN 6 a 10% (m/m), sem aquecimento (a 27°C) e agitação ultrassônica (20 kHz) por 60 min. O procedimento exibiu um fator de pré-concentração (F_c) igual a 13. A separação por CLAE foi realizada em colula C8, em fase móvel com Tampão fosfato (pH 7,0):ACN na proporção 69:31 (V/V), fluxo de 1,2 mL/min e detecção eletroquímica com DDB aplicando 1,40 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L). O processo foi devidamente validado, apresentando limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) de 14,5 μ g/L e 36,2 μ g/L, respectivamente. Estes valores são aproximadamente 240 vezes menores do que o que foi encontrado na literatura para determinação de TBZ em suco de uva integral. A recuperação do método foi avaliada entre 98,7% e 116,1% com coeficiente de variação entre 4,8% e 7,4%. A aplicação do método proposto permitiu detectar e determinar TBZ em uma das amostras de suco de uva integral branco comercial analisadas.

Palavras-chave: Detecção eletroquímica, Eletrodo de Diamante Dopado com Boro, Extração por Ponto Nuvem, Agrotóxicos, Suco de uva integral.

ABSTRACT

Whole grape juice, in Brazil and in the world, has been gaining prominence over the years as it represents an excellent option for wine, due to its provenance and in terms of substances with antioxidant potential, even though it can be consumed more widely by the population. The increase in consumption requires greater production capacity and, therefore, the improvement of management techniques and extensive use of intensive agricultural products, such as pesticides. Since the ingestion of these substances in food predicts different types of intoxication, acute or chronic, techniques with the potential to determine and detect them appear as a quality control measure. In this sense, the methodology proposed in this work aims to detect and determine the Thiabendazole (TBZ) fungicide in whole white grape juice, combining Cloud Point Extraction (CPE) with High Performance Liquid Chromatography (HPLC) coupled with electrochemical detection using a Boron-Doped Diamond electrode (DDB). In view of this, Cyclic Voltammetry and Differential Pulse techniques were used for the electrochemical characterization of TBZ and its behavior on the surface of the working electrode. From these techniques it was possible to select the best pH condition for the mobile phase (7.0), respecting the limits of use of the chromatographic column. The best conditions for extraction and pre-concentration of TBZ pointed to a CPE performed at pH 6.0, by adding 1mL of the surfactant Tergitol TMN 6 at 10% (m/m), without heating (at 27°C) and ultrasonic agitation (20 kHz) for 60 min. The procedure showed a pre-concentration factor (F_C) of 13. The HPLC separation was performed in C8 column, in mobile phase with Phosphate Buffer (pH 7.0):ACN in the ratio 69:31 (V/V), flow of 1.2 mL/min and electrochemical detection with DDB by applying 1.40 V x Ag/AgCl (3.0 mol/L). The process was duly validated, presenting limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of 14.5 $\mu\text{g/L}$ and 36.2 $\mu\text{g/L}$, respectively. These values are approximately 240 times lower than what was found in the literature for the determination of TBZ in whole grape juice. Method recovery was evaluated between 98.7% and 116.1% with a coefficient of variation between 4.8% and 7.4%. The application of the proposed method allowed the detection and determination of TBZ in one of the analyzed samples of commercial white whole grape juice.

Keywords: Electrochemical detection, Boron-Doped Diamond Electrode, Cloud Point Extraction, Pesticides, Whole Grape Juice.

LISTA DE FIGURAS

[Figura 1](#): Evolução da área superficial de uva mundial (Fonte: OIV (2021)).

[Figura 2](#): Estrutura molecular do Tiabendazol (TBZ) e suas características físico-químicas (Fonte: ANVISA (2020); Ferreira (2018)).

[Figura 3](#): Análise de percentual de uvas usadas para vinhos e sucos (Fonte: CONAB (2017)).

[Figura 4](#): Formação das micelas e separação de fases, por meio de extração com surfactante (Fonte: Yamini, Feizi e Moradi (2020)).

[Figura 5](#): Célula eletroquímica utilizada para as medidas voltamétricas, com eletrodo de trabalho (A), eletrodo referência (B) e contra-eletrodo (C). Ao lado, o eletrodo de trabalho desmontado, apresentando a forma de contato elétrico e a alocação do DDB (1 cm²).

[Figura 6](#): Equipamento de CLAE-EC utilizado para separação e detecção eletroquímica, A) Cromatografo/CLAE, B) Saída do detector UV-VIS, C) Detector eletroquímico e D) Potenciostato.

[Figura 7](#): Célula eletroquímica acoplada à saída do equipamento de CLAE e sua representação esquemática: a) entrada da célula, b) saída da célula, c) tubo de aço inox, d) ER Ag/AgCl (3,0 mol/L), e) anel de silicone, f) eletrodo de DDB e g) contato elétrico (Fonte: Adaptado de Andrade *et al.* (2009)).

[Figura 8](#): Voltamogramas cíclico do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em diferentes pH, faixa de potencial de 0,9 V a 1,6 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L), $\nu = 100$ mV/s e eletrólito suporte TF (0,01 mol/L).

[Figura 9](#): Voltamogramas de pulso diferencial do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em diferentes pH, na faixa de potencial de 0,75 V a 1,5 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L). $a = 50$ mV, escada de potencial = 5 mV e $\nu = 50$ mV/s.

[Figura 10](#): Relação entre os valores de I_{pa} e E_{pa} com o pH (faixa de 2,0 a 10), obtidos a partir do VPD da Figura 14.

[Figura 11](#): Frações das espécies do TBZ em função do pH e mecanismo de protonação e desprotonação (Fonte: Adaptado de Caixeta-Neta, 2019).

[Figura 12](#): Cronoamperograma referente ao estudo da composição da fase móvel após EPN (pH 7,0, 50 μL de TBZ $2,0 \times 10^{-3}$ mol/L, 36°C , Tergitol TMN 6 20% m/m e 15 min de agitação ultrassônica). FM = TF (pH 7,0):ACN (V/V), vazão de 1,0 mL/min e $E = 1,35 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

[Figura 13](#): Cronoamperograma do estudo da vazão da fase móvel após EPN (pH 7,0, 50 μL de TBZ $2,0 \times 10^{-3}$ mol/L, 36°C , Tergitol TMN 6 20% m/m e 15 min de agitação ultrassônica). FM = TF (pH 7,0):ACN de 69:31 (V/V) e $E = 1,35 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

[Figura 14](#): Voltamograma hidrodinâmico após EPN (pH 7,0, 50 μL de TBZ $2,0 \times 10^{-3}$ mol/L, 36°C , Tergitol TMN 6 20% m/m e 15 min de agitação ultrassônica) e relação entre $I_{\text{pico}}-I_{\text{base}} \times E$ (Figura inserida). FM = 69:31 (TF pH 7,0:ACN) e vazão = 1,2 mL/min.

[Figura 15](#): Cronoamperograma da detecção do TBZ extraído por EPN da matriz de suco de uva integral branco, sem TBZ (curva em vermelho), com TBZ (curva em azul), e mais concentrado (curva em verde). Na figura inserida, está o sinal dos picos do TBZ. Todos na proporção 50 μL extrato: 50 μL eluente, e o que adicionou-se +10 μL da solução TBZ padrão ($2,0 \times 10^{-3}$ mol/L). FM = 69:31 (TF pH 7,0:ACN), vazão de 1,2 mL/min e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

[Figura 16](#): Cromatograma da detecção TBZ extraído por EPN da matriz de suco de uva integral branco, sem TBZ (curva em vermelho), com TBZ (curva em azul), e mais concentrado (curva em verde). Na figura inserida, está o sinal dos picos do TBZ. Todos na proporção 50 μL extrato: 50 μL eluente, e o que adicionou-se +10 μL da solução TBZ padrão ($2,0 \times 10^{-3}$ mol/L). FM = 69:31 (TF pH 7,0:ACN), vazão de 1,2 mL/min, detecção por UV-VIS ($\lambda = 274 \text{ nm}$).

[Figura 17](#): Cronoamperograma das variações 3 e 4, relativas à adição de sal e à alteração de temperatura, no processo de obtenção das melhores condições da EPN (pH 7,0, 50 μL de TBZ $2,0 \times 10^{-3}$ mol/L, 15 min de agitação ultrassônica, 20% de solução Tergitol TMN 6 m/m). FM = 69:31 (TF pH 7,0:ACN), eletrodo de trabalho DDB, vazão = 1,2 mL/min e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

[Figura 18](#): Cronoamperograma da variação de pH no processo de obtenção das melhores condições da EPN (50 μL de TBZ $2,0 \times 10^{-3}$ mol/L, 27°C , adição de solução de Tergitol TMN 6

20% m/m em 15 min de agitação). FM = 69:31 (TF pH 7,0:ACN), vazão = 1,2 mL/min e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

[Figura 19](#): Relação entre $I_{\text{pico}}-I_{\text{base}} \times \text{pH}$, no processo de obtenção das melhores condições da EPN (50 μL de TBZ $2,0 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$, 27°C , adição de solução de Tergitol TMN 6 20% m/m em 15 min de agitação ultrassônica). FM = 69:31 (TF pH 7,0:ACN), vazão = 1,2 mL/min e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

[Figura 20](#): Cronoamperograma da variação concentração do surfactante Tergitol TMN 6 no processo de obtenção das melhores condições da EPN (pH 6, 0,50 μL de TBZ $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, 27°C e 15 min de agitação ultrassônica). FM = 69:31 (TF pH 7,0:ACN), vazão = 1,2 mL/min e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

[Figura 21](#): Relação entre $I_{\text{pico}}-I_{\text{base}} \times \% \text{ (m/m)}$ da concentração do surfactante Tergitol TMN 6 no processo de obtenção das melhores condições da EPN (pH 6,0, 50 μL de TBZ $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, 27°C e 15 min de agitação ultrassônica). FM = 69:31 (TF pH 7,0:ACN), vazão = 1,2 mL/min e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

[Figura 22](#): Cronoamperograma da variação do tempo de agitação no processo de obtenção das melhores condições do processo de EPN (pH 6, 50 μL de TBZ $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, 27°C e adição de 10% da solução de Tergitol TMN 6). FM = 69:31 (TF pH 7,0:ACN), vazão = 1,2 mL/min e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

[Figura 23](#): Relação entre $I_{\text{pico}}-I_{\text{base}} \times T$ no processo de obtenção das melhores condições do processo de EPN (pH 6,50 μL de TBZ $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, 27°C e adição de 10% da solução de Tergitol TMN 6). FM = 69:31 (TF pH 7,0:ACN), vazão = 1,2 mL/min e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

[Figura 24](#): Cronoamperograma obtido para o LD do método para determinação de TBZ em suco integral de uva verde após processo de EPN na melhor condição. FM = TF (0,01 mol L^{-1} , pH 7):ACN na proporção de 69:31 (V/V), volume de injeção de 20 μL e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

[Figura 25](#): Curva analítica obtida sob melhor condição do procedimento de EPN. FM = TF (0,01 mol L^{-1} , pH 7,0):ACN na proporção 69:31 (V/V), volume de injeção de 20 μL e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

[Figura 26](#): Curva analítica obtida sem procedimento de EPN. FM = TF (0,01 mol/L, pH 7,0):ACN na proporção 69:31 (V/V), volume de injeção de 20 μ L e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

[Figura 27](#): Cronoamperograma obtido por detecção eletroquímica do suco da Marca A, após processo de EPN na melhor condição, adicionando 3,75 μ mol/L da solução padrão de TBZ 1,0 μ g/mL e seu respectivo branco. FM = TF (0,01 mol L⁻¹, pH 7):ACN na proporção de 69:31 (V/V), volume de injeção de 20 μ L e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

[Figura 28](#): Cronoamperograma obtido por detecção eletroquímica do suco da Marca B, após processo de EPN na melhor condição, adicionando 3,75 μ mol/L da solução padrão de TBZ 1,0 μ g/mL e seu respectivo branco. FM = TF (0,01 mol L⁻¹, pH 7):ACN na proporção de 69:31 (V/V), volume de injeção de 20 μ L e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

[Figura 29](#): Cronoamperograma obtido por detecção eletroquímica do suco da junção dos sucos da Marca A e B, após processo de EPN na melhor condição, adicionando 3,75 μ mol/L da solução padrão de TBZ 1,0 μ g/mL e seu respectivo branco. FM = TF (0,01 mol L⁻¹, pH 7):ACN na proporção de 69:31 (V/V), volume de injeção de 20 μ L e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

[Figura A1](#): Voltamograma cíclico do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 2,0, realizado na faixa de potencial de 0,9 V a 1,6 V $\times \text{Ag/AgCl}$ (3,0 mol/L), $\nu = 100 \text{ mV/s}$, eletrólito suporte TF (0,01 mol/L).

[Figura A2](#): Voltamograma cíclico do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 3,0, realizado na faixa de potencial de 0,9 V a 1,6 V $\times \text{Ag/AgCl}$ (3,0 mol/L), $\nu = 100 \text{ mV/s}$, eletrólito suporte TF (0,01 mol/L).

[Figura A3](#): Voltamograma cíclico do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 4,0, realizado na faixa de potencial de 0,9 V a 1,6 V $\times \text{Ag/AgCl}$ (3,0 mol/L), $\nu = 100 \text{ mV/s}$, eletrólito suporte TF (0,01 mol/L).

[Figura A4](#): Voltamograma cíclico do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 5,0, realizado na faixa de potencial de 0,9 V a 1,6 V $\times \text{Ag/AgCl}$ (3,0 mol/L), $\nu = 100 \text{ mV/s}$, eletrólito suporte TF (0,01 mol/L).

[Figura A5](#): Voltamograma cíclico do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 6,0, realizado na faixa de potencial de 0,9 V a 1,6 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L), $\nu = 100$ mV/s, eletrólito suporte TF (0,01 mol/L).

[Figura A6](#): Voltamograma cíclico do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 7,0, realizado na faixa de potencial de 0,9 V a 1,6 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L), $\nu = 100$ mV/s, eletrólito suporte TF (0,01 mol/L).

[Figura A7](#): Voltamograma cíclico do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 8,0, realizado na faixa de potencial de 0,9 V a 1,6 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L), $\nu = 100$ mV/s, eletrólito suporte TF (0,01 mol/L).

[Figura A8](#): Voltamograma cíclico do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 9,0, realizado na faixa de potencial de 0,9 V a 1,6 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L), $\nu = 100$ mV/s, eletrólito suporte TF (0,01 mol/L).

[Figura A9](#): Voltamograma cíclico do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 10,0, realizado na faixa de potencial de 0,9 V a 1,6 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L), $\nu = 100$ mV/s, eletrólito suporte TF (0,01 mol/L).

[Figura A10](#): Voltamograma de pulso diferencial do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 2,0, realizado na faixa de potencial de 0,75 V a 1,5 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L). $a = 50$ mV, escada de potencial = 5 mV e $\nu = 50$ mV/s.

[Figura A11](#): Voltamograma de pulso diferencial do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 3,0, realizado na faixa de potencial de 0,75 V a 1,5 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L). $a = 50$ mV, escada de potencial = 5 mV e $\nu = 50$ mV/s.

[Figura A12](#): Voltamograma de pulso diferencial do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 4,0, realizado na faixa de potencial de 0,75 V a 1,5 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L). $a = 50$ mV, escada de potencial = 5 mV e $\nu = 50$ mV/s.

[Figura A13](#): Voltamograma de pulso diferencial do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 5,0, realizado na faixa de potencial de 0,75 V a 1,5 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L). $a = 50$ mV, escada de potencial = 5 mV e $\nu = 50$ mV/s.

[Figura A14](#): Voltamograma de pulso diferencial do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 6,0, realizado na faixa de potencial de 0,75 V a 1,5 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L). $a = 50$ mV, escada de potencial = 5 mV e $\nu = 50$ mV/s.

[Figura A15](#): Voltamograma de pulso diferencial do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 7,0, realizado na faixa de potencial de 0,75 V a 1,5 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L). $a = 50$ mV, escada de potencial = 5 mV e $\nu = 50$ mV/s.

[Figura A16](#): Voltamograma de pulso diferencial do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 8,0, realizado na faixa de potencial de 0,75 V a 1,5 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L). $a = 50$ mV, escada de potencial = 5 mV e $\nu = 50$ mV/s.

[Figura A17](#): Voltamograma de pulso diferencial do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 9,0, realizado na faixa de potencial de 0,75 V a 1,5 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L). $a = 50$ mV, escada de potencial = 5 mV e $\nu = 50$ mV/s.

[Figura A18](#): Voltamograma de pulso diferencial do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 10,0, realizado na faixa de potencial de 0,75 V a 1,5 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L). $a = 50$ mV, escada de potencial = 5 mV e $\nu = 50$ mV/s.

LISTA DE TABELAS

[Tabela 1](#): Características do Tergitol TMN-6 (Fonte: Adaptado de Sigma-Aldrich e De Amorim (2015)).

[Tabela 2](#): Resumo das metodologias de EPN para diferentes amostras e analitos.

[Tabela 3](#): Resumo das detecções da utilização do eletrodo de DDB para diferentes amostras e analitos.

[Tabela 4](#): Preparação de amostras com eluentes, TF e ACN para injeção.

[Tabela 5](#): Exatidão (%) e precisão (%) intradia e interdia, obtidas na determinação eletroquímica do TBZ após processo de EPN. FM = TF (0,01 mol/L, pH 7,0):ACN na proporção 69:31 (V/V), volume de injeção de 20 μ L. $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

[Tabela 6](#): Recuperação (R%) e exatidão (CV%), obtidas na determinação eletroquímica do TBZ em outras amostras de suco de uva integral branco. FM = TF (0,01 mol L⁻¹, pH 7,0):ACN na proporção 69:31 (V/V), volume de injeção de 20 μ L. $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

[Tabela 7](#): LD, LQ, R% e DPR% de estudos apresentados na literatura, referentes à determinação de TBZ em várias matrizes, utilizando diferentes métodos de extração e análise.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN - Acetonitrila

Agrofit - Sistema de Agrotóxico e Fitossanitário do MAPA

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP - Adenosina Trifosfato

CE - Contra Eletrodo

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-EC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à detecção eletroquímica

CLAE-UV - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Ultravioleta

CMC - Concentração Micelar Crítica

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento

DDB - Diamante Dopado com Boro

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DO - Denominação de Origem

DRfA - Dose de Referência Aguda

EFS - Extração por Fase Sólida

EFSA - European Food Safety Authority

ELL - Extração Líquido-Líquido

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EMEA - Evaluation of Medicinal Products

EPN - Extração por Ponto Nuvem

E_{pa} - Potencial de Pico Anódico

ER - Eletrodo de Referência

ET - Eletrodo de Trabalho

F - Constante de Faraday

F_c - Fator de pré-concentração

FM - Fase Móvel

HLB - Balanço hidrofílico-lipofílico

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Ibravin - Instituto Brasileiro de Vinhos
IDA - Ingestão Diária Aceitável
IG - Indicação Geográfica
Inmetro - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IP - Indicação de Procedência
I_p_a - Corrente de Pico anódico
Ipea - Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada
LD - Limite de Detecção
LMR - Limite Máximo de Resíduos
LQ - Limite de Quantificação
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MISPE-SERS - Espectroscopia Raman, com detecção de polímeros impressos molecularmente
OIV - Organização Internacional de Vinho
PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
RDC - Resolução da Diretoria Colegiada
SIDRA - Sistema IBGE de Recuperação Automática
SISORG - Sistema Brasileiro de Avaliação da Conformidade Orgânica
TBZ - Tiabendazol
VC - Voltametria Cíclica
VOQ - Voltametria de Onda Quadrada
VPD - Voltametria de Pulso Diferencial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	26
1.1 Aspectos gerais	26
1.2 Agrotóxicos.....	29
1.2.1 Agrotóxicos na cultura da uva e o Tiabendazol.....	31
1.2.2 Suco de uva.....	35
1.3 Extração por Ponto Nuvem (EPN).....	38
1.4 Eletrodo de Diamante Dopado com Boro (DDB) e detecção eletroquímica	46
1.5 Validação do método	50
1.5.1 Limite de Quantificação	50
1.5.2 Limite de Detecção	51
1.5.3 Curva com EPN e sem EPN.....	51
1.5.4 Exatidão	51
1.5.5 Precisão	51
1.5.6 Seletividade.....	52
2. OBJETIVOS	53
2.1 Objetivo Geral.....	53
2.2 Objetivos Específicos.....	53
3. MATERIAIS E MÉTODOS	54
3.1 Pré-tratamento do eletrodo de DDB	54
3.2 Caracterização eletroquímica do Tiabendazol	54
3.3 Célula Eletroquímica	55
3.4 Voltametria Cíclica e Voltametria de Pulso Diferencial.....	55
3.5 EPN	56
3.6 Obtenção das melhores condições de análise por CLAE-EC	56
3.7 Obtenção das melhores condições da EPN	58
3.8 Validação do método	59
3.8.1 Limite de Quantificação e Detecção	59
3.8.2 Curva com EPN e sem EPN: metodologia.....	59

3.8.3 Exatidão, Precisão e Seletividade.....	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1 Comportamento do TBZ sobre superfície do DDB.....	61
4.2 CLAE-EC.....	64
4.3 Voltamograma Hidrodinâmico	66
4.4 Obtenção das melhores condições para EPN.....	69
4.5 Validação do método	74
4.5.1 Limite de detecção e quantificação.....	74
4.5.2 Fator de pré-concentração.....	75
4.5.3 Exatidão e Precisão intradia e interdia.....	76
4.5.4 Aplicação do método EPN/CLAE-EC.....	77
5 CONCLUSÃO.....	83
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXO.....	94

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

A uva é o fruto da Videira (*Vitis sp.*), uma planta da família *Vitaceae*, de origem asiática, que é uma trepadeira lenhosa, com gavinhas de fixação, apresentando mais de oito mil variedades (OIV, 2016). É comercializada *in natura*, utilizada na produção de sucos, doces, vinhos e passas.

As principais variedades de uva encontradas no Brasil para mesa, até o ano de 2004 (LEÃO, 2004), são: com sementes – Itália, Red Globe, Benitaka, Brasil, Patrícia; sem sementes – Superior Seedless, Crimson Seedless, Thompson Seedless, Catalunha; além de outras variedades como Vênus, Marroo Seedless e Perlette. Na última década, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) desenvolveu um programa para criação de novas variedades, tais como: a BRS Vitória, BRS Isis, BRS Nubia, BRS Melodia, BRS Tainá e BRS Magna (LEÃO, 2021).

Do ponto de vista da produção, a área destinada para o cultivo da cultura da uva, em contexto mundial, tem enfrentado quedas e desde 2017 atingiu uma provável estabilidade ([Figura 1](#)). Apesar dessas constantes quedas e da relativa estagnação, a área destinada ao cultivo da uva ainda está acima de 7,3 milhões de hectares, com países como Espanha, França, China e Itália ocupando, respectivamente, os lugares de maiores produtores (OIV, 2021).

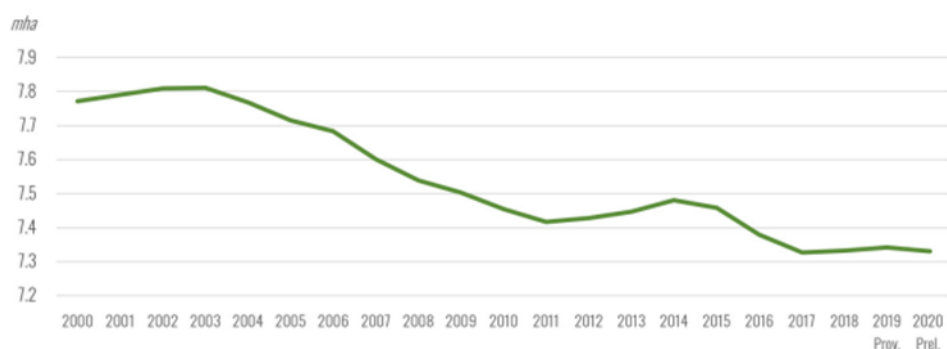


Figura 1: Evolução da área superficial de uva mundial (Fonte: OIV (2021)).

Segundo a análise de conjuntura realizada pela Organização Internacional de Vinho (OIV, 2021), as oscilações constantes de consumo de vinho (que em contexto mundial ainda é o destino principal da uva) e as mudanças climáticas provocadas pelo El Niño nos últimos anos

(com maior quantidade de chuvas) são os principais fatores relacionados à diminuição da área cultivada. Os últimos dados apresentados, no *site* da mesma organização, em relação à produção de uva apontam que, em 2016, foi atingido 75,5 milhões de toneladas de uva fresca destinadas para todos os usos, com 27,6 milhões de toneladas para mesa, atingindo 97,77% de consumo.

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2020), na análise mensal de dezembro 2019 a janeiro 2020, os principais produtores de uva destinada para vinho seguiram as tendências externas de redução de área cultivada. Os Estados Unidos, Argentina e Chile (6º, 7º e 8º lugar como produtor mundial de vinho, respectivamente) diminuíram sua área em 1,2%, 1,3% e 0,6%, nesta ordem. O Brasil por sua vez, em 2018, foi para o 20º lugar no *ranking* mundial, com redução de 2,7%.

A expansão territorial da produção de uva no Brasil é recente. Até o final de 1950, a viticultura comercial brasileira estava restrita somente ao Sul e Sudeste, sendo representada pelos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul. Posteriormente, a cultura da uva expandiu suas fronteiras rumo ao Nordeste e Centro-Oeste do país, atingindo atualmente regiões da Bahia, Ceará e Goiás. Para conseguir tamanha expansão ao longo dos anos, o setor apresentou elevado grau de aprimoramento de técnicas de plantio, seleção de clones e novas cultivares adaptadas para as diferentes regiões (contando com mais de 120 cultivares de *Vitis vinifera* e mais de 40 cultivares de uvas americanas, incluindo castas de *Vitis labrusca*, *Vitis bourquina* e de híbridas interespecíficas), além de definição de diferentes tecnologias de manejo (CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011).

A produção de uva no Brasil, com o passar do tempo e com os investimentos no setor, vem demonstrado consolidação, apesar da constante oscilação que acompanha as variações de mercado e produção do exterior. Em 2016, a produção interna de uva apresentou o menor valor da década, atingindo um valor 54% menor do que no ano anterior (CONAB, 2019), decorrente de fatores climáticos e infestações de pragas. No ano de 2017, apresentou a melhor produção da década até então, atingindo 752 mil toneladas (recorde nacional) referentes ao estado do Rio Grande do Sul, maior produtor nacional da cultura.

Em agosto de 2021, o Sistema IBGE de Recuperação Automática (SIDRA) apontou que a produção de uva atingiu seu patamar de 1,68 milhões de toneladas (crescimento de 19,1% em relação ao ano anterior), 74,9 mil hectares de área plantada (+0,21%) e 74,2 mil hectares de área colhida ou a ser colhida (+1,37%). O rendimento, nesse mesmo período, aponta um valor de 22,7

mil quilogramas por hectare para todo o país (17,6% maior do que o relativo ao mesmo período do ano anterior). Para atingir tamanha produção e conseguir cultivar a vitivinicultura em tantas regiões, com clima e solo diferentes, faz-se necessária a melhoria da técnica de cultivo e manejo, além da utilização de defensivos agrícolas e controle de pragas e doenças.

A cultura da uva tem em si muitas peculiaridades que fazem com que a sua produção se restrinja a condições mais específicas, como a necessidade de radiação solar intensa para aumento da produção de teores de açúcares. A temperatura do ar deve estar entre 25°C e 30°C e, quando relacionado à baixa precipitação pluvial, obtém-se maior concentração de açúcares e menor concentração de ácido málico nos frutos. A umidade do ar também tem sua importância, tanto nos aspectos fisiológicos quanto no favorecimento do surgimento de doenças fúngicas (durante todo o ciclo), necessitando de maior atenção em regiões áridas, onde a umidade do ar é menor. A velocidade do vento atua tanto negativamente, quando está alta, na formação dos frutos causando danos mecânicos, como positivamente fazendo com que ocorra uma reposição de ar seco para manutenção da evapotranspiração da cultura. Esta é considerada resistente à seca, pela sua característica de possuir um sistema de raízes que são capazes de atingir grandes profundidades, facilitando seu cultivo em regiões áridas e semiáridas com menor precipitação pluviométrica, onde há maior controle da irrigação, para que se evite o surgimento de doenças fúngicas e pragas (LEÃO, 2004).

A cultura apresenta outras características em relação aos nutrientes necessários para seu cultivo, tais como os descritos no Informe Técnico da EMBRAPA (LEÃO, 2004), sendo eles o nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, boro, cobre e zinco. A deficiência desses nutrientes retarda ou inibe o desenvolvimento vegetativo e radicular, podendo ser expressos na má formação dos frutos e diminuição dos cachos, no surgimento de manchas e escurecimento de folhas. O solo deve ter seu pH corrigido por meio da técnica de calagem, neutralizando os efeitos tóxicos do alumínio e manganês, e elevando os teores de cálcio e magnésio. A adubação da Videira é realizada no plantio, no crescimento e na produção, abastecendo e reabastecendo a cultura com os nutrientes necessários para cada fase.

Durante seu cultivo, a região e o clima se tornam propensos para o surgimento de doenças e pragas que podem ser combatidas por defensivos agrícolas. As técnicas de aplicação desses compostos na uva também envolvem a pulverização aérea e, quando utilizadas de forma

desmedida, deixam contaminantes no solo, nos lagos e nos rios, nos frutos *in natura* e em toda sua cadeia de produtos.

1.2 Agrotóxicos

Segundo a Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto nº 4.074, de 2002, os agrotóxicos são definidos como: “Compostos de substâncias químicas destinadas ao controle, destruição ou prevenção, direta ou indiretamente, de agentes patogênicos para plantas e animais úteis e às pessoas” (BRASIL, 1989). O Brasil como país de grande extensão territorial está cada vez mais consolidado no mercado agropecuário, tornando-se um dos maiores produtores do ramo e o segundo maior exportador. Por consequência, existe uma intensiva utilização de agrotóxicos, fertilizantes e sementes transgênicas.

Conforme o documento apresentado pelo Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – IPEA (MORAES, 2019), os últimos dados do setor, até o momento, mostram que no ano de 2015 o país atingiu um total de 9,2% de utilização de pesticidas referentes à quantidade mundial. Em outros termos, o Brasil tem média de consumo por área de 4,3 kg por hectare e 1,8 kg per capita (MORAES, 2019). Até 2018, somente a região Sul do país era responsável pelo consumo de 30% desses agrotóxicos (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018).

Os principais dados apontados até o momento são referentes até o ano de 2015, pois, como indicado por Pignati *et al.* (2017) e Lopes e Albuquerque (2018), existe no Brasil uma insuficiência de dados relativa às novas aquisições de agrotóxicos por parte dos institutos governamentais e da bancada ruralista. No ano de 2016, por exemplo, não houve realização do Censo Agropecuário.

Os agrotóxicos são formulados visando combater agentes específicos. Por isso, são categorizados em inseticidas (combate insetos), acaricidas (combatem ácaros), nematicidas (combatem nematóides), fungicidas (combatem fungos) e herbicidas (combatem plantas daninhas).

De acordo com os gráficos apresentados pelo Sistema de Agrotóxico e Fitossanitário do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) – Agrofit (2021), desde 2017 houve um aumento no registro de agrotóxicos no Brasil, registros esses que se mantinham praticamente constantes há décadas, atingindo o pico de 319 em 2020. A maioria desses produtos possui classificação ambiental II (44,7%, “Produto muito perigoso ao meio ambiente”) e III

(34,3%, “Produtos perigosos ao meio ambiente”), sendo das classes herbicida, inseticida e fungicida.

O potencial de gerar impactos ambientais e à saúde humana está relacionado a inúmeros fatores, dentre esses a técnica e o período de aplicação, a distância de ambientes aquáticos, zonas urbanas e comunidades, além de fatores atrelados à estrutura do composto químico utilizado, como a sua capacidade de foto e biodegradação. Os impactos ambientais e à saúde humana são variados, tendo a capacidade de atuar no genoma de peixes, degradar a microbiota aquática, alterar os estômatos de plantas, além de levar à intoxicação humana, danificar os mecanismos de defesa, causar transtornos mentais em trabalhadores, entre outros (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018).

Em razão dos potenciais impactos à saúde humana decorrentes da exposição de resíduos de agrotóxicos nos alimentos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na Resolução de Diretoria Colegiada (RDC nº 295, de 29 de julho de 2019, p. 1;2) estabelece critérios em relação à exposição dietética aguda e crônica:

Exposição dietética aguda: “estimativa da exposição máxima de um indivíduo a resíduos de agrotóxicos em alimentos consumidos em um período de 24 horas, expressa em miligrama de resíduo por quilograma de peso corpóreo (mg/kg p.c.)”.

Exposição dietética crônica: “estimativa da ingestão diária per capita de resíduo de agrotóxico em alimentos, ao longo da vida, expressa em miligrama de resíduo por quilograma de peso corpóreo (mg/kg p.c.)”.

Essas substâncias químicas apresentam níveis variados de risco à saúde humana, em curto ou longo prazo, necessitando de avaliações em relação à Ingestão Diária Aceitável (IDA) e à Dose de Referência Aguda (DRfA), que estão relacionadas à:

quantidade estimada de substância presente nos alimentos que pode ser ingerida diariamente ao longo da vida, sem oferecer risco apreciável à saúde do consumidor, expressa em miligrama de substância por quilograma de peso corpóreo (mg/kg p.c.); da durante um período de até 24 horas, sem oferecer risco apreciável à saúde do consumidor, expressa em miligrama de substância por quilograma de peso corpóreo (mg/kg p.c.), respectivamente (ANVISA, RDC nº 295, 29 jul. 2019, p. 1).

Os agrotóxicos, portanto, devem ser registrados na ANVISA, no Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) e no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA), com as classificações toxicológicas, incluindo o tempo no qual o trabalhador pode voltar à área aplicada, para evitar qualquer risco à saúde.

1.2.1 *Agrotóxicos na cultura da uva e o Tiabendazol*

Em 2015, de acordo com o SIDRA, a cultura da uva apresentou consumo de 936312,00 L de agrotóxicos, o que em termos de taxa de consumo por área plantada chega a 12 L por hectare (PIGNATI *et al.*, 2017). Com isso, aproximadamente 179 novos agrotóxicos foram registrados para a cultura da uva até agosto de 2021 (somando 964, nos últimos 5 anos). Destes, a maioria deles foi registrada na classe de inseticidas, herbicidas e fungicidas, destacando-se os organofosforados da classe dos inseticidas, e piretróides, carbamatos da classe dos fungicidas (MAPA, 2021).

Os inseticidas são substâncias utilizadas para matar insetos, ovos e larvas de insetos. Dentre os inseticidas halogenados, temos os organofosforados, que são extremamente tóxicos aos seres humanos, mas são eficazes no combate a pragas e apresentam pouca persistência no meio ambiente; e os organoclorados, que, por sua estrutura química, tem elevada estabilidade química e, conseqüentemente, alta permanência na natureza. Estes foram banidos pela Comissão de Paris e União Europeia em 1992 (FLORES *et al.*, 2004), e o dicofol ($C_{14}H_9Cl_5O$) é liberado por ser solúvel em água e possuir baixa toxicidade relativa aos agrotóxicos (ALVES, 2014).

Os fungicidas, por sua vez, são compostos químicos utilizados para o controle de doenças causadas por fungos, sendo usados para proteger a cultura antes do fungo se instalar (protetores) ou para erradicar o fungo, quando esse estiver presente na planta, inibindo a proliferação (erradicantes) (ALVES, 2014).

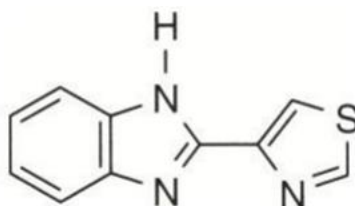
Segundo o último relatório realizado pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA, 2019), em 319 amostras de uva, 49 apresentaram agrotóxicos em concentrações residual acima do Limite Máximo de Resíduos (LMR) e 48 apresentaram agrotóxicos não autorizados para a cultura. De acordo com a ANVISA (RDC nº 295, 29 jul. 2019, p. 2), o LMR é definido como:

quantidade máxima de resíduo de agrotóxico oficialmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada do agrotóxico numa fase específica,

desde sua produção até o seu consumo, expresso em miligrama de resíduo por quilograma de alimento (mg/kg).

Dentre os agrotóxicos não autorizados (LMR = 0) para a cultura da uva, está o Tiabendazol (TBZ), encontrado tanto em amostras de uva (PARA, 2019), quanto em amostras de suco de uva integral (ALVES, 2014).

O TBZ ([Figura 2](#)) é um composto químico do grupo dos benzimidazóis e foi desenvolvido pela empresa Merck & Co. Inc, em 1962, para tratamento de helmintos (vermes multicelulares com sistemas digestivo, excretor, nervoso e reprodutor) em humanos e animais (OLIVEIRA; TOLEDO, 1999 *apud* CAIXETA-NETA, 2019). A partir de 1968, começou também a ser utilizado na agricultura, na pós-colheita, no combate a doenças causadas pelos fungos *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium* e *Fusarium*. Sua via de ação inclui o comprometimento do citoesqueleto através de uma interação seletiva com a proteína b-tubulina, inibindo sua biossíntese (EFSA, 2016).



Nome Comercial	TECTO® SC
Ingrediente ativo	Tiabendazol
Fórmula Molecular	C ₁₀ H ₇ N ₃ S
Registro no MAPA	8396
Composição	485 g/L (48,5% m/v)
Tipo de Formulação	Suspensão Concentrada
Classe	Fungicida sistêmico
Grupo Químico	Benzimidazol
Estado físico, cor	Líquido, branco
pH	4 a 8 (solução 1%)
Densidade	1,17 g/cm ³ a 20°C
Viscosidade	55,4 a 323 mPa.s a 40°C
Solubilidade (a 20°C)	pH 4: 160 mg/L pH 7: 30 mg/L pH 10: 30 mg/L

Figura 2: Estrutura molecular do Tiabendazol (TBZ) e suas características físico-químicas (Fonte: ANVISA (2020); Ferreira (2018)).

De classificação toxicológica classe IV (“pouco tóxico”), com IDA = 0,1 mg/kg p.c. e classificação ambiental II (muito perigoso ao meio ambiente), é utilizado em ampla variedade de culturas, com aplicação foliar, em sementes, bulbo, e na pós-colheita (PARA, 2019; ANVISA, 2021). Segundo Ferreira (2018), o TBZ é um composto orgânico cuja solubilidade depende do pH do meio, devido a sua característica polar e ionizável (uma vez ionizada, a molécula que tinha característica apolar, torna-se polar ao adquirir cargas e, portanto, cria uma interação eletrostática com a água, aumentando sua solubilidade). Com isso, diferentes faixas de pH facilitarão o aparecimento majoritário de uma de suas formas catiônica, aniônica e zwitteriônica (estrutura química com carga positiva e negativa).

As similaridades relacionadas à estrutura química dos benzimidazóis com ação fungicida levaram a um histórico de avaliações sobre seu risco ambiental, animal e à saúde humana, realizados por comissões nacionais e internacionais. A Comissão Europeia é um desses órgãos que apresentam revisões e pareceres constantes, sob a diretriz do European Food Safety Authority (EFSA) e The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), referentes aos LMR permitidos em alimentos e IDA.

Em 2016, a Comissão Europeia determinou ao EFSA uma nova revisão, referente à Regulamentação (EU) n° 1141/2010, em relação aos LMR permitidos para o fungicida TBZ em alimentos, provocando a diminuição dos limites ao levarem em conta novos estudos de risco de intoxicação aguda e crônica (EFSA, 2016). A partir dessa avaliação, perceberam que alguns dados ainda eram inconclusivos e comunicaram a necessidade de mais estudos para a diminuição de risco ao consumidor.

Apesar de o TBZ ser ainda considerado de baixa toxicidade aguda, estudos recentes revelaram casos de intoxicação crônica, uma vez que é um composto estável, podendo acumular no organismo e causar sérios danos à saúde. De acordo com os estudos realizados pelo grupo de Tada, Fujitani e Yoneyama (1992), Tada *et al.* (2001a, 2001b) e Fujitani, Tada e Yoneyama (1999), a principal via de ação do TBZ está localizada no trato urinário, principalmente nos rins e na bexiga. Os autores Tada, Fujitani e Yoneyama (1992) e Fujitani, Tada e Yoneyama (1999) sugerem que o fungicida leva à necrose celular dos túbulos proximais, por ser capturado por células presentes no tecido do córtex renal (através do sistema de transporte de cátions

orgânicos), levando à inibição da respiração mitocondrial e, por consequência, à diminuição de ATP (Adenosina Trifosfato).

Os estudos referentes à avaliação toxicológica do TBZ no trato urinário apresentaram resultados muito similares. Fujii, Mikuriya e Sasaki (1991) estudaram a administração de TBZ, em ratos, de até 0,4% do nível dietético em 104 semanas. Em todas as dosagens, os tecidos renais sofreram hiperplasia (aumento do número de células do tecido) e baixa ocorrência de mutações no sistema urinário. Os ratos, na maior dosagem, apresentaram diminuição do peso corporal, incidência significativa de adenoma das glândulas prepuciais dos machos. Com até 0,5%, em 78 semanas, os resultados foram similares, destacando-se o aumento da massa da bexiga, atrofia renal e ovariana, e formação de cálculo nos rins e na bexiga (TADA *et al.*, 2001a). Até a concentração de 0,8%, a taxa de mortalidade dos camundongos e ratos manteve-se baixa, atingindo 90% na submissão de 1,6% de dosagem por 44 semanas (TADA *et al.*, 2001b). Em todos os ratos e camundongos tratados, foram encontradas alterações macroscópicas nos tecidos da bexiga e dos rins.

Séide *et al.* (2016), por sua vez, observaram que no intervalo de 1h a 24h (intoxicação aguda) o TBZ (200-500 $\mu\text{mol/L}$) intensificou a morte celular dos hepatócitos (células presentes nos rins, que também são responsáveis pelo metabolismo de nutrientes e pela síntese de proteínas e moléculas) e a redução da capacidade mitocondrial.

Nos humanos, o TBZ pode apresentar menor toxicidade, com efeitos adversos, tais como: náusea, vômito, diarreia, sonolência, vertigem, cefaléia (dor de cabeça), anorexia e xerostomia (ressecamento da boca). Na bula do Mintezol, Merk & Co. Inc. (1983) são encontradas contra-indicações de seu uso, porque casos indicaram causas, em menor frequência, de febre, exantema e eritema multiforme (incluindo síndrome de Stevens-Johnson). Em raras vezes são encontrados casos de zumbido, distúrbios visuais, leucopenia, angioedema, cristalúria e colestase intra-hepática.

É possível que as principais causas de tais efeitos adversos estejam relacionadas à extensa metabolização do TBZ no organismo humano, formando compostos como di-hidroxi-tiabendazol, 4-hidroxi-tiabendazol e 4-acetil-benzimidazol (metabólitos diretos), além de outros metabólitos subsequentes (THELINGWANI *et al.*, 2009). Ekman *et al.* (2014) estudaram a metabolização do TBZ em amostras de urina humana, a partir de seu metabólito e biomarcador, 5-hidroxi-tiabendazol, uma vez que consideraram seus efeitos adversos em mamíferos (ratos e

coelhos), no fígado, nos rins, além dos possíveis efeitos teratogênicos e de toxicidade no sistema reprodutivo.

O TBZ também foi avaliado como tóxico para organismos aquáticos (como peixes e crustáceos, principalmente Daphnias). Conforme Schmidt e Wonka (2013) e Ferreira (2018), ao ser ingerido na forma de suspensão, o TBZ apresenta pico de concentração no plasma sanguíneo no intervalo de 1h a 2h após ingestão, com meia-vida de aproximadamente 70 min.

Uma vez apresentando seu comportamento tóxico em diversos organismos de mamíferos como ratos, camundongos e coelhos, cria-se uma alerta ao perigo à saúde humana, principalmente quando este agrotóxico é encontrado em amostras de alimentos nos quais não é permitido, tais como uva e suco de uva.

1.2.2 *Suco de uva*

A produção e a comercialização do suco de uva tiveram início por volta do ano de 1869, nos Estados Unidos da América (EUA), sendo Thomas Welch e seu filho os criadores de uma técnica, que

Consiste em aquecer a uva (desgranada, esmagada ou não), de modo que haja amolecimento ou dissolução parcial das partes sólidas das bagas (polpas e cascas), liberando o suco nelas contido. O aquecimento da uva íntegra ou esmagada a temperaturas compreendidas entre 70°C e 90°C para extração de cor, separação do mosto e engarrafamento a quente (GUERRA *et al.*, 2016, p. 10).

A produção do suco integral no Brasil iniciou-se em 1920, nas regiões Sul e Sudeste, sendo difundida posteriormente, a partir de 1960, com o avanço da fronteira viticultora.

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Vinhos (Ibravin), retirados do relatório de análise mensal da CONAB (2017) e ilustrados na [Figura 3](#), o aumento da produção de sucos de uva, a partir do montante destinado ao setor de derivados, representa por consequência, praticamente, uma equivalência entre estes e o destinado ao vinho.



Figura 3: Análise de percentual de uvas usadas para vinhos e sucos (Fonte: CONAB (2017)).

Levando-se em consideração somente os anos de 2010 e 2015, a comercialização do suco de uva integral apresentou aumento relativo de 239,38% e o concentrado de 18,39% (IBRAVIN, 2015). Atualmente, o projeto desenvolvido pelo Ibravin conta com 16 empresas no setor, apoiando e incentivando a produção de suco de uva integral no Brasil.

No ano de 2019, o país exportou cerca de 3,7 milhões de vinhos e espumantes (queda de 7,5% em relação ao ano anterior). A CONAB (2020) avalia que um dos motivos para essa redução da exportação brasileira de vinhos está na queda da produção de uva industrial na safra 2018/19. Outro fator apontado é o aumento da demanda do suco de uva, fazendo com que muitas vinícolas ampliassem sua produção de suco de uva, tendência essa que está sendo apresentada desde 2004 (Figura 3). Nessa mesma análise, a partir dos dados do Ibravin, em 2019, o volume de outros derivados da uva, como o suco, superou o volume de vinhos no Rio Grande do Sul (maior produtor de vinho brasileiro) pela primeira vez na série histórica.

O suco de uva se diferencia em três tipos, segundo o MAPA:

- i. Concentrado - é o suco parcialmente desidratado, obtido por meio de processo tecnológico adequado, apresentando concentração mínima equivalente a 65° Brix em sólidos naturais da fruta (quanto mais alto o °Brix, maior será a doçura e a qualidade do fruto/suco);
- ii. Desidratado - é o produto sob a forma sólida, obtido pela desidratação do suco da uva, remoção de 97% de água;
- iii. Reprocessado ou reconstituído - é o produto obtido pela diluição do concentrado e/ou desidratado até a sua concentração natural. Tem designação “integral” ou “simples”, para suco

de uva sem adição de açúcares e na sua concentração natural, e “suco adoçado” na dimensão mínima de $\frac{1}{4}$ e máxima de $\frac{1}{10}$ em massa de açúcar (GUERRA *et al.*, 2016).

Além disso, são comercializados como sucos de uva tinto, rosado e branco, produzidos por diferentes cultivares de uva e espécies. Para a produção de suco de uva tinto são utilizadas as variedades Concord, Isabel e Bordô (*V. labrusca*); para o suco branco são utilizadas a Niágara (*V. labrusca*), Itália, Moscato e Chardonnay (*V. vinifera*); para o rosado, por sua vez, usa-se a combinação das variedades Bordô e Niágara (ALVES, 2014). Em 2011, a EMBRAPA lançou novas variedades de uva para produção de suco, tais como: BRS Rúbea, Concord Clone 30, Isabel Precoce, BRS Cora, BRS Violeta e BRS Carmem (RITSCHER *et al.*, 2011).

Estudos têm apontado que a uva apresenta uma grande variedade de ácidos fenólicos, antocianinas, flavonoides e taninos (CHEYNIER, 2005; MALACRIDA; MOTTA, 2005; MAKRIS; KALLITHRAKAB; KEFALAS, 2006; GOLLÜCKE; SOUZA; TAVARES, 2008). Os polifenóis e antocianinas, por sua vez, são conhecidos como importantes antioxidantes que ajudam na prevenção de doenças cardiovasculares, combate ao câncer, retardamento de doenças degenerativas neurológicas como Alzheimer e redução da pressão arterial (DANI *et al.*, 2009; DANI *et al.*, 2008).

Uma vez que o suco de uva integral é desenvolvido a partir da trituração das partes da fruta, é possível encontrar os mesmos componentes da uva no suco. Aguiar Jr. *et al.* (2011) observaram que o suco de uva tem a capacidade de diminuir o dano oxidativo ao DNA provocado pelo peróxido de hidrogênio em células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos e plaquetas). O mesmo foi observado por De Moura *et al.* (2014) ao administrar suco de uva concentrado para prevenção da intoxicação com cloreto de cádmio. Segundo trabalho desenvolvido por Lamas *et al.* (2017), a administração de suco de uva em ratos foi capaz de reduzir a acumulação e intoxicação por cádmio, protegendo a estrutura e a contagem dos espermatozoides.

Os sucos integrais apresentam em sua composição, de forma geral, de 81% a 86% de água, baixos teores de lipídeos, proteínas e fibra alimentar, açúcares (predominantemente glicose e frutose), ácidos orgânicos (tais como o tartárico, málico, cítrico e succínico) e alguns minerais, como potássio, cálcio, magnésio, ferro, cobre, zinco, manganês, sódio e lítio (RIZZON; MENEGUZZO, 2007; RIZZON; MIELE, 2012; RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998; RIZZON; LINK, 2006).

Troian, Vicenzi e Alves (2016) realizaram um estudo comparativo de polifenóis e resveratrol em suco de uva integral, reconstituído e néctar. Os autores descreveram que os valores encontrados não atingiram o que foi observado na literatura, utilizando o mesmo método, mas serviu como base para confirmar que os valores de polifenóis e resveratrol em suco de uva integral são bem maiores, atingindo uma média de 85,75 mg/L e 1,15 mg/L, respectivamente.

Os açúcares são os principais sólidos solúveis no suco e os ácidos orgânicos são aqueles que conferem pH característico entre 2,90 e 3,43. A cor e o sabor da bebida estão relacionados aos seus compostos antioxidantes (antocianinas, fenólicos, taninos e flavonoides) e o aroma do suco está relacionado a compostos como acetato de etila, acetato de 2-feniletila, 3-hidroxibutirato de etila (aroma frutal), (Z)-óxido de linalol (aroma floral), 1-hexanol (aroma herbal) (ALVES, 2014).

Assim, considerando-se o aumento anual da produção e da preferência do suco de uva e levando-se em conta a constante alteração dos LMR de agrotóxicos, como o TBZ com comprovada incidência residual (ALVES, 2014; ANVISA, 2020), faz-se necessário o desenvolvimento e a validação de metodologias cada vez mais sensíveis, seletivas e rápidas para detecção e quantificação de agrotóxicos em suco de uva.

1.3 Extração por Ponto Nuvem (EPN)

Para que se possa analisar, pré-concentrar e detectar substâncias em amostras reais (tais como as alimentícias) é necessário incluir procedimentos de extração e concentração dos analitos de estudo. Por meio desses métodos, o analito é separado em grande parte da amostra de origem, evitando ou diminuindo os interferentes. Para os agrotóxicos, a história não é diferente, ainda mais quando se espera que sejam encontrados em níveis de traço ($\mu\text{g/L}$ ou $\mu\text{g/kg}$, ppb).

As técnicas de separação mais utilizadas são a Extração Líquido-Líquido (ELL) e a Extração por Fase Sólida (EFS). Estas apresentam muitas vantagens em relação à capacidade de extração. Entretanto, segundo Yamini, Feizi e Moradi (2020), as técnicas de ELL e EFS possuem a desvantagem de não serem facilmente integradas com os equipamentos analíticos, pois necessitam de uma grande quantidade de solventes orgânicos tóxicos, além de encontrarem limitações em termos de seletividade, uma vez que coextraem compostos da amostra que podem interferir na determinação dos analitos. Por consequência, outras técnicas para extração mais limpas e “verdes” surgem como alternativa para este fim.

A EPN é uma dessas técnicas desenvolvidas com o objetivo de minimizar o custo de preparo da amostra, concomitante com a diminuição do uso de solventes e o aumento da seletividade. A técnica foi desenvolvida por Hiroto Watanabe e Hiroaki Tanaka em 1978, ao testar a capacidade do surfactante 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol em extrair zinco (II) da água.

Os surfactantes são compostos que, por sua característica físico-química (estrutura que apresenta partes hidrofílica e hidrofóbica), têm a habilidade de dissolver compostos orgânicos, que eram insolúveis ou pouco solúveis em água (WATANABE; TANAKA, 1978), envolvendo esses compostos em micelas. Existem quatro tipos de surfactantes, de acordo com Yamini, Feizi e Moradi (2020):

- I. Não iônicos: são aqueles cuja cabeça hidrofílica é neutra, a qual não pode ser ionizada em solução aquosa (tais como monolaurato de glicerol, Triton X-100, Tergitol e Tween 80);
- II. Aniônicos: são aqueles cuja cabeça hidrofílica apresenta característica aniônica e cauda de baixa polaridade (tais como éter sulfatos aril e alkyl, dodecil sulfato de sódio, lauril sódio e estearato de sódio);
- III. Catiônicos: são aqueles cuja cabeça hidrofílica apresenta característica catiônica e cauda de baixa polaridade (tais como sais quaternários de amônio, sais de amina graxo, cloreto de dimetil-benzil amônio e brometo de cetiltrimetilamônio);
- IV. Zwitteriônicos: são aqueles que apresentam cabeças com característica catiônica e aniônica (tais como sulfobetaína, aminoácidos e fosfolipídeos).

A formação das micelas acontece por um fenômeno de agregação entre os surfactantes, no seio da fase aquosa. Neste fenômeno, os surfactantes agrupam os componentes que têm característica hidrofóbica em um centro, tendo interação intermolecular com sua cauda hidrofóbica. Quando isso ocorre, com o passar do tempo e da agregação entre surfactantes, sua cabeça hidrofílica fica organizada para fora desse centro, direcionada para a região aquosa. Ocorre, então, uma saturação superficial resultante da diminuição da tensão superficial, propiciando a formação das micelas. A concentração de surfactante necessária para essa formação é chamada de Concentração Micelar Crítica (CMC), a qual está diretamente ligada com a saturação superficial (YAMINI; FEIZI; MORADI, 2020).

Entende-se que, para que o analito seja incorporado pelo surfactante e, portanto, fique dentro do centro da micela (a qual tem caudas hidrofóbicas), ele também deve ter a característica hidrofóbica. Não a tendo, torna-se necessário encontrar formas de proporcionar essa interação (MORTADA, 2020).

Com a formação das micelas, nota-se uma disposição em duas fases: uma rica em colóides (componentes com dimensão no intervalo entre 1 nm a 1 μ m), na qual estão presentes o extrato e a fase aquosa. A fase extratora, rica em colóides, é produzida pelo processo de coacervação, que tem por característica dividir o sistema em dois líquidos imiscíveis. A fase extratora vai ser mantida também pela combinação das interações intermoleculares, podendo ser suprimidas por fatores que atrapalham a interação, ou fortalecidas, levando à precipitação (YAMINI; FEIZI; MORADI, 2020).

Para a formação das micelas, além da concentração do surfactante (colocado em excesso), o ambiente micelar deve ser alterado. Alterações no meio que facilitem as interações eletrostáticas entre os colóides e fortaleçam as forças opostas entre os colóides e a vizinhança provocam melhor separação de fases e, conseqüentemente, aumentam a eficiência da extração (ROCHA, 2013; YAMINI; FEIZI; MORADI, 2020; MORTADA, 2020). Os fatores que alteram o ambiente são:

- I. Aumento da temperatura e frequência de agitação, que favorecem as interações entre os colóides, formados pela agregação dos surfactantes;
- II. Alteração do pH do meio, fazendo com que as espécies ionizáveis adquiram uma estrutura capaz de ser incorporada na micela. O pH tem a capacidade de estabilizar essas estruturas;
- III. Adição de desidratantes, como álcoois e sais (efeito *salting-out*). A adição dos sais faz com que os compostos não eletrólitos (que não transportam carga) se tornem menos solúveis, por aumentar as interações hidrofóbicas entre as micelas, com conseqüente remoção de água;
- IV. Etapa adicional de centrifugação facilita a separação de fases.

A separação de fases pode acontecer de duas formas, com densidade inferior à matriz, ficando na parte de cima (A), ou apresentando densidade superior à matriz, ficando na parte de baixo (B), como mostrado na [Figura 4](#).

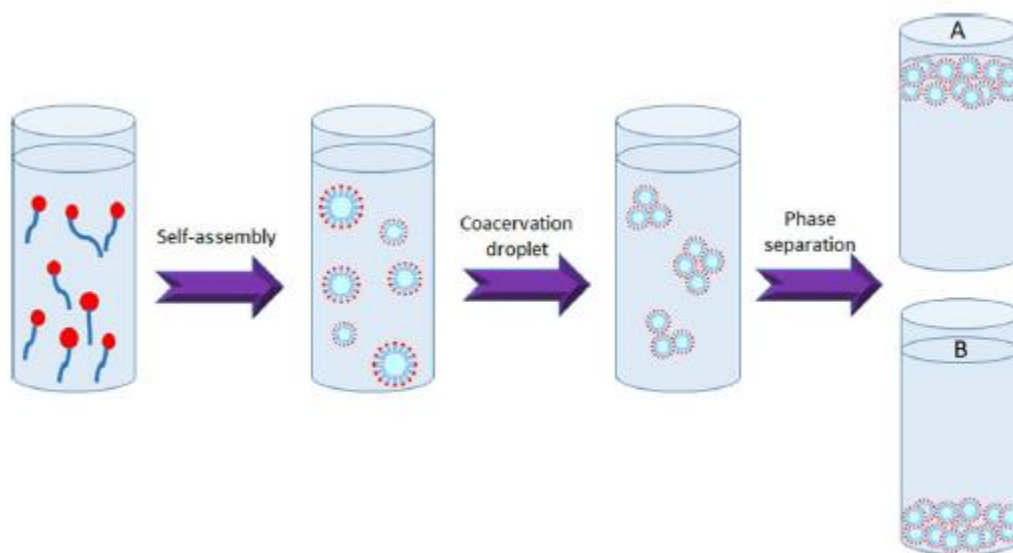


Figura 4: Formação das micelas e separação de fases, por meio de extração com surfactante (Fonte: Yamini, Feizi e Moradi (2020)).

O ponto nuvem é atingido a uma temperatura suficiente para o qual os compostos dissolvidos não estão mais completamente solúveis, sendo precipitados pela fase coloidal (YAMINI; FEIZI; MORADI, 2020). Quando não se atinge este ponto, não é formada a fase rica em colóide.

Segundo Mortada (2020), o efeito *salting-out*, a depender do surfactante e da matriz, tem a capacidade de diminuir a temperatura para a formação da nuvem (ponto nuvem), podendo induzi-la em temperatura ambiente, identificado pela turbidez da solução. Isso acontece pela capacidade dos ions dos sais em interagirem com as moléculas de água da solução, diminuindo a força de interação dela com as do analito e entre elas, favorecendo a interação surfactante-analito e surfactante-surfactante. Quando terminada a técnica, o analito, além de separado, estará extraído na fase extratora da EPN, adicionando mais um fator positivo à técnica, a pré-concentração.

Um dos benefícios da técnica de EPN é a capacidade do método em realizar pré-concentração, por meio da coacervação, colocando em pouco volume grande concentração do analito de interesse. Essa capacidade é ampliada com a otimização do método. Como discutido por Rocha (2013), De Amorim (2015) e Caixeta-Neta (2019), o fator de pré-concentração (F_C) – ou fator de enriquecimento – pode ser melhor estudado realizando duas curvas analíticas, com e sem extração. A partir delas, é possível obter duas equações de reta e, então, seus coeficientes

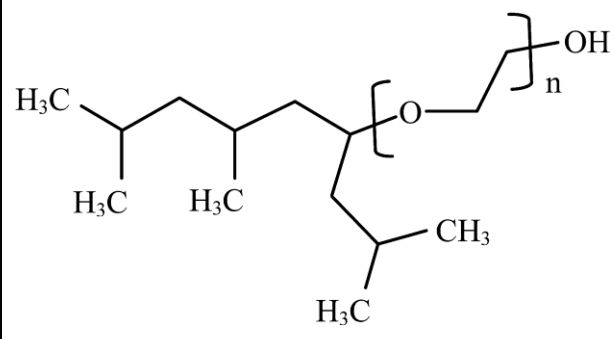
angulares. O F_c (Equação 1) é o resultado do quociente entre o coeficiente angular da curva com extração (a_1) e coeficiente angular da curva sem extração (a_2).

$$F_c = a_1/a_2$$

Equação 1

No presente trabalho, foi utilizado o surfactante não-iônico Tergitol TMN 6 (CAS: 60828-78-6), cujas características estão expostas na [Tabela 1](#). Sendo um surfactante não iônico, apresenta cauda hidrofóbica, com cabeça hidrofílica não ionizável. Já foi utilizado para extração e pré-concentração de agrotóxicos (CAIXETA-NETA, 2019), hormônios (DE AMORIM, 2015), antioxidantes (CHEN *et al.*, 2012) e metais (SONG *et al.*, 2012; ZOU *et al.*, 2014).

Tabela 1: Características do Tergitol TMN-6.

Estrutura Química*	
Peso molecular	538 g/mol
Densidade	1,01 g/mL (20°C)
HLB (Balanço hidrofílico-lipofílico)	13,1
Temperatura de ponto nuvem	36°C
CMC	800 ppm

*TMN-3 (n~3), TMN-5(n~5), TMN-6 (n~8) e TMN-10(n~11).

Fonte: Adaptado de Sigma-Aldrich e De Amorim (2015).

A EPN é uma técnica relativamente recente, mas nas últimas décadas vem sendo empregada em muitos trabalhos nos mais variados contextos. As revisões apresentadas por Kori (2019), Mortada (2020) e Yamini, Feizi e Moradi (2020) mostram o potencial dela e sua comprovada utilização para diferentes analitos, matrizes e sua combinação com outras técnicas de separação e detecção. Destaca-se aqui, pelo propósito deste trabalho, alguns trabalhos envolvendo a EPN em matrizes alimentares, com foco na extração de agrotóxicos.

Zhang, Duan e Wang (2011) desenvolveram uma metodologia para determinação de sulfonamidas em amostras de leite, utilizando a EPN e a Cromatografia de Alta Eficiência, com detecção UV-VIS. Foi escolhido, dentre os surfactantes estudados (PEG4000, Tween 20, Triton X-100, Triton X-114), o Triton X-100. A partir das condições ótimas (50°C, 30 min de banho ultrassônico, concentração de 60 g/L, 65 µL de hidróxido de amônio para alteração do pH, 0,4 mL de álcool n-butílico como desidratante, 0,240g de sulfato anidro de sódio como eletrólito), obteve-se um limite de detecção (LD) para os analitos no intervalo entre 2,23µg/L a 9,79 µg/L. Os resultados mostraram excelente linearidade (>0,9999) e valores de recuperação foram obtidos no intervalo de 67% a 105,7%.

Santaladchayakit e Srijaranai (2012) estudaram a associação da agitação ultrassônica com a EPN para determinar um antihelmíntico da classe benzimidazol (incluindo TBZ) em amostras de água e leite. A técnica também foi associada com a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os autores investigaram os parâmetros que afetam o ambiente micelar para otimização da técnica. Com isso, obtiveram a melhor condição com 0,75% de Triton X-114 (m/v), acetato de sódio 7% (m/V), 2 min de agitação ultrassônica e 10 min de centrifugação. Obtiveram uma linearidade na faixa de 0,1µg/L a 100 µg/L, com coeficiente de correlação 0,996, LD na faixa de 0,005-0,1 µg/L, recuperação de 81,6%-11,4% (em água) e 75,3%-11,4% (leite).

Liu *et al.* (2014) investigaram a capacidade da EPN em extrair quatro herbicidas da classe triazina em leite, com associação por CLAE-UV. Utilizaram o surfactante Triton X-100. A condição de extração foi de pH 5, 60°C, 30 min de banho ultrassônico. O sobrenadante foi removido e diluído em metanol, centrifugado e filtrado em membrana antes da análise em CLAE. Com as condições ótimas, foi obtida uma média de recuperação na faixa de 70,5-96,9%, com LD entre 6,79 µg/L e 11,19 µg/L, limite de quantificação (LQ) entre 50µg/L e 2000 µg/L, e coeficiente de correlação 0,9999.

Mohd *et al.* (2018) também desenvolveram uma estratégia de extrair pesticidas de amostras de leite para detecção por espectrofotometria (UV-VIS). Para isso, utilizaram a EPN com surfactante não anímico 3-(3-hydroxypropyl-heptatrimethylxyloxane). Avaliaram a alteração dos parâmetros de extração (pH, temperatura, sal, concentração e volume do surfactante, tempo de incubação). A condição ótima foi obtida com LD de 1,06 µg/L (atrazina) e 1,22 µg/L (propazina), LQ de 3,54 µg/L (atrazina) e 4,07 µg/L (propazina) e recuperação no intervalo de 81%-108%.

Seebunrueng, Santaladchaiyakit e Srijaranai (2012) testaram a eficiência da EPN utilizando a mistura de surfactante catiônico (de tamanhos de cadeia diferentes) e surfactante aniônico, e separação e determinação por CLAE-UV. O método foi desenvolvido para extração de agrotóxicos organofosforados em amostras de abacaxi, maçã e pomelo. Os autores obtiveram condições ótimas com (i) SDS-DTAB: mistura de surfactantes na proporção 15 mmol/L de dodecil sulfato de sódio (aniônico) com 1,0 mmol/L de brometo de dodeciltrimetilamônio (catiônico), na presença de NaCl 15% (m/V), e (ii) SDS-CTAB: mistura de 10 mmol/L de dodecil sulfato de sódio (aniônico) com 1,0 mmol/L de cetiltrimetil brometo de amônio (catiônico), na presença de NaCl 10% (m/V). A combinação SDS-DTAB apresentou melhor capacidade extratora (66%-85%) e de recuperação (77%-106%), atingindo baixos valores de LD (0,003mg/kg - 0,01 mg/kg).

Liu *et al.* (2012) investigaram a capacidade extratora do Tergitol 15-S-7 por EPN de inseticidas da classe carbamato e compostos ftalatos (aditivos) em vegetais. A técnica foi associada à determinação por CLAE-UV. A partir das condições ótimas (surfactante na concentração de 1% V/V, Na₂SO₄ 0,5 mol/L, temperatura de 40°C por 10 min, em pH 5,0), os autores obtiveram boa linearidade ($R^2 = 0,9984$), LD para os inseticidas de 0,003µg/L (carbaril) e 0,015µg/L (pirimicarbe) e, para os ftalatos, 0,012 µg/L (ftalato de dimetila) e 0,006 µg/L (ftalato de dietila).

Khammas e Ahmad (2016) estudaram dois métodos de EPN com Triton X-114 para extração do fungicida carbendazim em matrizes ambientais (água e solo) e alimentares (tomate, pepino e laranja), sem uma técnica de separação. Nos dois métodos, houve a formação de complexos coloridos, para posterior detecção em UV-VIS. No primeiro deles, o fungicida foi oxidado por uma reação com ferro (II) em meio ácido, formando um complexo azul (detectado em 685 nm). No segundo, o mesmo fungicida foi oxidado com ferro (II) e 2,2-bipiridina formando complexo alaranjado (detectado em 521 nm). A extração avaliada em ambos com Triton X-114 resultou em diferentes condições ótimas. Para o primeiro método, 4×10^{-5} mol/L de FeCl₃ (responsável pela cor), 4×10^{-5} mol/L de K₃Fe(CN)₆ (agente oxidante), 0,1 mol/L de H₃PO₄ (solubilização do complexo na fase rica em surfactante), 0,8% de surfactante, banho de 55°C por 15 min e pH 4,0. Para o segundo método, 8×10^{-5} mol/L de FeCl₃ (responsável pela formação do complexo), 8×10^{-5} mol/L de 2,2-bipiridina, 0,6% de surfactante, banho de 60°C por 30 min e pH 3,0. Para ambos os métodos, a recuperação superou 95%. Para o primeiro e o

segundo método, respectivamente, os LD foram de 0,46 ng/mL e 0,49 ng/mL, LQ de 1,53 ng/mL e 1,65 ng/mL e coeficiente de correlação de 0,9995 e 0,9997.

Caixeta-Neta *et al.* (2020) desenvolveram um método de EPN para extração e pré-concentração do fungicida TBZ em amostras de tomate e determinação por CLAE com detecção eletroquímica (eletrodo de Diamante Dopado com Boro – DDB). Na extração, utilizaram o surfactante Tergitol TMN 6 e agitação ultrassônica, otimizando o método por planejamento fatorial, com os fatores: tempo de banho sob agitação (15 min), temperatura de ponto nuvem (36°C), concentração de surfactante (19% V/V) e quantidade de sal (0,83 g). O pH neste estudo foi obtido em uma etapa separada. Sob condições otimizadas, foram obtidos LD de 5,4 µg/L, LQ de 11 µg/L, recuperação entre 80,7% e 115,1% e coeficiente de variação na média de três dias, menor do que 15%.

Para fins comparativos, a [Tabela 2](#) apresenta os resultados obtidos pelos diferentes trabalhos que utilizam a EPN em matrizes alimentares, com foco na extração de agrotóxicos:

Tabela 2: Resumo das metodologias de EPN para diferentes amostras e analitos.

Amostra	Analito	Surfactante	Metodo analítico	LD	LQ	Autor
Leite	Classe das Sulfonamidas (antimicrobiano)	Triton X-100	CLAE-UV	2,23 a 9,79 µg/L	-	Zhang, Duan e Wang (2011)
Leite e água	Classe dos Benzimidazois (anti-helmínticos)	Triton X-114	CLAE-DAD	0,005 a 0,1 µg/L	-	Santaladchaiyakit e Srijaranai (2012)
Leite	Classe das Triazinas (herbicidas)	Triton X-100	CLAE-UV	50 a 2000 µg/L	-	Liu <i>et al.</i> (2014)
Leite	Atrazine e Propazine (herbicidas)	3-(3-hydroxypropyl-heptatrimethylx yloxane)	UV-VIS	1,06 µg/L (atrazine) e 1,22 µg/L (propazine)	3,54 µg/L (atrazine) e 4,07 µg/L (propazine)	Mohd <i>et al.</i> (2018)
Abacaxi, maçã e pomelo	Classe dos Organofosforados (combatem vários tipos de agentes)	SDS-DTAB (combinação de surfactantes)	CLAE-UV	0,003 a 0,01 mg/kg	-	Seebunrueng, Santaladchaiyakit e Srijaranai (2012)
Vegetais	Classe dos Carbamatos e ftalatos (inseticidas)	Tergitol 15-S-7	CLAE-UV	0,003 µg/L (carbaril); 0,015 µg/L (pirimicarbe); 0,012 µg/L (ftalato de dimetila) e 0,006 µg/L (ftalato de	-	Liu <i>et al.</i> (2012)

				dietila)		
Água, solo, tomate, pepino e laranja	Carbedazin (fungicida)	Triton X-114 com complexos corantes	UV-VIS	0,46 µg/L e 0,49 µg/L	1,53 µg/L e 1,65 µg/L	Khammas e Ahmad (2016)
Tomate	TBZ (fungicida)	Tergitol TMN 6	CLAE-EC	5.4 µg/L	11 µg/L	Caixeta-Neta <i>et al.</i> (2020)

O TBZ também foi extraído em análises de matrizes alimentares por meio de extração em fase sólida, como visto no trabalho de Feng *et al.* (2017). Foi estudada a possibilidade de determinação de TBZ em suco de laranja, por meio da técnica de Espectroscopia Raman, com detecção de polímeros impressos molecularmente (sigla MISPE-SERS). Seu estudo apresentou uma condição ótima de determinação, levando apenas 23 min, incluindo preparação de amostra. Obteve-se um LD de 4 ppm para o TBZ em suco de laranja. Os autores afirmaram que o sistema pode ser modificado para análise múltipla, podendo melhorar ainda mais a análise de produtos nocivos em alimentos.

1.4 Eletrodo de Diamante Dopado com Boro (DDB) e detecção eletroquímica

Apesar de toda eficácia em extração e pré-concentração apresentada na técnica da EPN, trabalhos mais recentes apontam algumas limitações para a utilização desta ao acoplá-la com detecção UV-VIS. Surfactantes que apresentam grupos cromóforos (principalmente na presença de anéis aromáticos) têm a tendência de serem detectados e, quando associados à CLAE, causam mascaramento de outros compostos nos primeiros tempos de retenção. Nesse sentido e considerando essa possibilidade, detectores eletroquímicos têm sido sugeridos para superação do fenômeno anteriormente descrito (YAMINI; FEIZI; MORADI, 2020; MORTADA, 2020).

Com o constante desenvolvimento dos métodos eletroanalíticos e com o surgimento das inúmeras demandas, cria-se a necessidade da formulação de detectores cada vez mais sensíveis, com a possibilidade de incluir procedimentos de dopagens e modificações de superfícies. Os eletrodos mais utilizados para detecção eletroquímica são a platina, o ouro e os carbonos ligados em sp^2 (por exemplo, fibra de carbono, carbono vítreo e grafite pirolítico).

Diferentemente dos eletrodos convencionais de carbono, os carbonos ligados em estruturas sp^3 , como os do diamante, apresentam características únicas, destacando-se pela baixa e estável corrente de fundo, ampla janela de potencial em meios aquosos e não-aquosos, extraordinária estabilidade morfológica e microestrutural a altas densidades de corrente (por

exemplo, 0,1-10 A/cm², em H₃PO₄ 85%), boa resposta a alguns analitos aquosos e não-aquosos, após pré-tratamento convencional, e estabilidade na resposta a longo prazo como, por exemplo, após exposição ao ar durante meses. Entretanto, para se obter condutividade elétrica suficiente para medidas eletroquímicas, filmes de diamante devem ser dopados com uma concentração mínima de átomos de dopante, sendo que o boro atualmente é o dopante mais utilizado. A dopagem com boro (facilitada por ter um elétron a menos e raio menor) transforma o material em um bom condutor, com rápida transferência de elétrons, tornando-o condutor sempre que as dopagens resultem em concentrações superiores a 10²⁰ átomos de boro por cm³ (MUZYKA *et al.*, 2019).

O eletrodo de DDB possui boa biocompatibilidade, apresentando respostas com baixa corrente capacitiva e menor sensibilidade ao oxigênio dissolvido em solução, em muitos casos não precisando de desoxigenação do eletrólito suporte (DRAGOE *et al.*, 2006). Outro fator importante é sua flexibilidade quanto ao uso, por possuir capacidade de modificação da superfície com pré-tratamentos catódico e anódico, os quais normalmente são definidos de acordo com as características dos analitos de estudo. Por causa dessas características e da possibilidade de pré-tratamento da superfície do eletrodo de DDB, ele é encontrado na literatura associado a trabalhos que envolvem tanto detecção quanto degradação, como mostrado nas revisões de Jevtić *et al.* (2019) e destacado por Muzyka *et al.* (2019), em diversos tipos de matriz. Pelo intuito deste trabalho, sua utilização para detecção de agrotóxicos tem sido investigada e um resumo dos trabalhos encontrados na literatura é apresentado a seguir.

Dornellas *et al.* (2013) desenvolveram um método de determinação do pesticida kresoxim-metil em suco de uva, utilizando a Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) e eletrodo de DDB. Observaram uma característica irreversível de oxidação do analito. Nas condições ótimas (pH 4, frequência de 30Hz, amplitude de potencial de 50 mV, escada de potencial de 15 mV), obtiveram um coeficiente linear de 0,999, com concentração na faixa de $8,7 \times 10^{-7}$ mol/L - $3,4 \times 10^{-5}$ mol/L. A partir da extração por fase sólida, obtiveram uma recuperação de 91,6%-105,3%.

Dornellas, Nogueira e Aucello (2014) investigaram o potencial do eletrodo DDB em determinar a pyraclostrobin, em água e suco de uva. Nas condições ótimas (eletrólito suporte em pH 4,0 e 0,05 mol/L, amplitude de potencial de 40 mV, degrau de potencial de 30 mV e frequência de 30Hz), obtiveram correlação linear de 0,99 em concentrações acima de $2,0 \times 10^{-5}$

mol/L e LQ de $8,2 \times 10^{-7}$ mol/L e LD de $2,5 \times 10^{-7}$ mol/L. A partir da técnica de extração em fase sólida, obtiveram recuperação de $102 \pm 13,8\%$ (adição de $5,4 \times 10^{-5}$ mol/L) para suco de uva e entre 94%-102% para amostra de água.

Benbrahim *et al.* (2016) utilizaram o método de VOQ com eletrodo DDB (pré-tratamento com VC) para determinação do inseticida imidacloprida em suco de ameixa vermelha. Foi obtido um pico de catódico, em $-1,21$ V × eletrodo de calomelano saturado (ECS). Nas condições ótimas (eletrólito suporte Na_2SO_4 0,05 mol/L, pH 7,0, amplitude de pulso de 50 mV, degrau de potencial de 10 mV e frequência de 100 Hz), um coeficiente linear de 0,999 foi obtido para uma faixa de concentração de 30 mol/L - $200 \times \mu\text{mol/L}$ em água. Os LD e LQ obtidos foram de $8,6 \times 10^{-6}$ mol/L e $28,6 \times 10^{-6}$ mol/L, respectivamente. As taxas de recuperação da extração variaram de 96,6%-100,9%.

Stankovic e Kalcher (2016) comprovaram a capacidade do DDB em detectar e quantificar o pesticida iziran, utilizando a técnica de análise por injeção de fluxo com detecção amperométrica (FIA-EC). Na melhor condição (pH 4,0, potencial 0,55 V, velocidade de varredura de 50 mV/s e fluxo de 0,4 mL/min), atingiu-se uma correlação linear de 0,9938 para faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-8}$ mol/L a $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L. O LD foi de $2,7 \times 10^{-9}$ mol/L.

Ribeiro *et al.* (2018) realizaram um estudo de detecção do pesticida formetanato, em amostras de fruta, com DDB pré-tratado catodicamente. Utilizaram VC para estudo do comportamento eletroquímico e VOQ para detecção e quantificação. As condições ideais do método voltamétrico foram: pH 7 (tampão Britton-Robinson, 0,04 mol/L), frequência de potencial de pulso de 20 s^{-1} , amplitude de pulso de 25 mV e escada de potencial de 3 mV. Utilizando as melhores condições obtiveram um coeficiente linear de 0,9997 para faixa de concentração entre $4,98 \times 10^{-7}$ mol/L - $1,70 \times 10^{-5}$ mol/L de formetanato. Além disso, atingiram uma recuperação de 95,2%-104% (manga) e 96,5%-105,2% (uva), provando a boa capacidade do método e do eletrodo em identificar e quantificar pesticidas em amostras de fruta.

Duarte *et al.* (2018) estudaram a possibilidade de detectar múltiplos resíduos de herbicidas (diuron, 2,4-ácido diclorofenoxiacético e tebuthiuron) utilizando eletrodo de DDB tratado catodicamente por meio de VPD. A extração por fase sólida foi realizada em amostras de água e atingiu 96%-104% de recuperação. A partir das condições otimizadas de detecção (amplitude de pulso 108 mV, velocidade de varredura 92 mV/s), obtiveram uma curva analítica com correlação linear de 0,99 na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L - $9,0 \times 10^{-6}$ mol/L

para diuron e 2,4-ácido diclorofenoxiacético e $2,5 \times 10^{-6}$ mol/L - $22,5 \times 10^{-6}$ mol/L para tebuthiuron. O LD atingido foi de $0,035 \times 10^{-6}$ mol/L para diuron, $0,12 \times 10^{-6}$ mol/L para 2,4 ácido diclorofenoxiacético e $0,34 \times 10^{-6}$ mol/L para tebuthiuron.

Jevtić *et al.* (2018) investigaram um método para detecção do herbicida bentazone por VPD, com eletrodo DDB (pré-tratado anodicamente em 2V em H₂SO₄ 0,5 mol/L e catodicamente em 2 V, por 180 s) em amostras de água. Nas melhores condições de VPD (amplitude de pico de 150 mV, tempo de pulso de 10 ms), obtiveram uma correlação linear de 0,993, na faixa de concentração de $2,0 \times 10^{-6}$ mol/L - 100×10^{-6} mol/L e LD de $0,5 \times 10^{-6}$ mol/L para VPD em pH 4.

Como apontado acima e na [Tabela 3](#), o eletrodo de DDB (com pré-tratamento catódico ou anódico) apresentou, em todos os trabalhos destacados, elevada estabilidade, reprodutibilidade, sensibilidade, para os métodos descritos e aplicados para diferentes matrizes. Entretanto, para melhorar os LD e LQ dos métodos eletroquímicos bem como promover seletividade, a associação com técnicas de separação, como a cromatografia, torna-se muitas vezes essencial e necessária.

Tabela 3: Resumo das detecções da utilização do eletrodo de DDB para diferentes amostras e analitos.

Amostra	Analito	Metodo analítico	LD	LQ	Autor
Suco de uva	Kresoxim-metil (pesticida)	VOQ	Não especificado (na ordem de $\mu\text{mol/L}$)	Não especificado (na ordem de $\mu\text{mol/L}$)	Dornellas <i>et al.</i> (2013)
Suco de uva e água	Pyraclostrobin (fungicida)	VOQ	0,25 $\mu\text{mol/L}$	0,82 $\mu\text{mol/L}$	Dornellas, Nogueira e Aucello (2014)
Suco de ameixa vermelha	Imidacloprida (inseticida)	VOQ	8,6 $\mu\text{mol/L}$	28,6 $\mu\text{mol/L}$	Benbrahim <i>et al.</i> (2016)
Água de rio	Iziran (pesticida)	FIA-EC	2,7 nmol/L	-	Stankovic e Kalcher (2016)
Manga e uva	Formetanato (pesticida)	VOQ	0,37 $\mu\text{mol/L}$	1,2 $\mu\text{mol/L}$	Ribeiro <i>et al.</i> (2018)
Água	Diuron, 2,4-ácido diclorofenoxiacético e tebuthiuron (herbicidas)	VPD	0,035 $\mu\text{mol/L}$ (diuron); 0,12 $\mu\text{mol/L}$ (2,4-ácido diclorofenoxiacético) e 0,34 $\mu\text{mol/L}$ (tebuthiuron)	-	Duarte <i>et al.</i> (2018)
Água	Bentazone (herbicida)	VOQ	0,5 $\mu\text{mol/L}$	-	Jevtić <i>et al.</i> (2018)

O emprego da CLAE acoplada à detecção eletroquímica (CLAE-EC), neste trabalho, está associado à técnica eletroanalítica, conhecida por amperometria. Ela é empregada, geralmente, para determinações eletroquímicas em fluxo. Nessa técnica, ao contrário das voltamétricas, as determinações são feitas com um potencial fixo, gerando um gráfico de corrente (i) em função do tempo (t). Para isso, o potencial utilizado deve ser aquele que proporcione melhor sinal analítico de corrente.

A combinação das duas, portanto, proporciona melhor separação do analito da matriz que, no caso de agrotóxicos em alimentos, são adotadas colunas C8 e C18 por apresentarem fase estacionária reversa, com melhor capacidade para separação de compostos orgânicos e uma detecção com LD baixos. Os primeiros trabalhos que utilizaram da CLAE-EC foram desenvolvidos pelo grupo do Professor Ralph N. Adams, da Universidade do Kansas-EUA (KISSINGER; REFSHAUGE; ADAMS, 1973), os quais, desde então, estabeleceram dois princípios básicos para o emprego desse tipo de análise, a saber: i. as espécies devem ser eletroativas e ii. o eluente (fase móvel) deve permitir a condução elétrica e, por conseguinte, atuar como um eletrólito suporte.

1.5. Validação do método

Para garantir confiabilidade sobre novos métodos analíticos propostos, estes devem passar por protocolos de validação. Institutos, Agências e Comissões são algumas das instituições que estabelecem regulamentos relativos à validação de métodos, tendo como exemplo as que são utilizadas como referência neste trabalho, tais como: o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), a ANVISA (também a partir do MAPA) e a Comissão Europeia. O documento DOQ-CGCRE-008 (Jun/2020), do Inmetro, define que:

1.5.1 Limite de Quantificação

Abaixo da faixa de concentração, existe um fator limitante ao qual é dado o nome de Limite de Quantificação (LQ). Esse diz respeito ao menor valor no qual o método consegue quantificar a concentração do analito na amostra. Os documentos estabelecem que ele pode ser obtido a partir de diferentes métodos, como Percepção visual, Relação Sinal/Ruído, Curva analítica, Desvio padrão do branco e Curva de desvios padrão. Quando escolhida a relação Sinal/Ruído, onde se compara os sinais de amostras com baixa concentração conhecida e dos

ruídos dos brancos da amostra (na mesma região), constatando a concentração mínima determinada com confiança, adota-se a razão 10:1.

Comumente, a concentração do LQ pode ser igual ou maior que o primeiro ponto da curva analítica, ou como a concentração mais baixa nos casos de análises em nível de traços.

1.5.2 Limite de Detecção

O Limite de Detecção (LD), por sua vez, é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob as condições estabelecidas para o ensaio. Isso pode variar em função do tipo de amostra. O limite é obtido por procedimentos similares ao LQ (Percepção visual, Relação Sinal/Ruído, Curva analítica, Desvio padrão do branco e Curva de desvios padrão). Para a relação Sinal/Ruído adota-se uma razão de 3:1.

1.5.3 Curva com EPN e sem EPN

A curva analítica tem como objetivo demonstrar a linearidade do método dentro da faixa de trabalho, assim como obter concentrações dos analitos de interesse na matriz de estudo. A EPN utiliza das duas curvas para determinar o fator de pré-concentração (F_C) do método, a partir da razão entre os coeficientes angulares.

1.5.4 Exatidão

A exatidão (ou recuperação, R%) de um método é a proximidade do valor por ele obtido/observado com o valor considerado de referência (esperado, relativo ao adicionado na amostra), como apresentado na [Equação 2](#).

$$R (\%) = \frac{\text{Concentração observada}}{\text{Concentração esperada}} \times 100\% \quad \text{Equação 2}$$

1.5.5 Precisão

A precisão, por sua vez, corresponde ao grau de aproximação de resultados obtidos por meio da repetibilidade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, expressas pelo desvio padrão (DP) e pelo coeficiente de variação (CV, às vezes representado como DPR% – Desvio Padrão Relativo). Assume-se, então:

$$CV (\%) = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média determinada}} \times 100\% \quad \text{Equação 3}$$

i. A repetibilidade expressa termos de dispersão entre os resultados, podendo ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou até adição do analito ao branco da amostra em várias concentrações na faixa de trabalho. Para isso, o documento sugere de seis a 15 repetições independentes (com inclusão de todas as etapas no preparo de amostra) por material de estudo. Nesse tipo de estudo, são realizados testes em três níveis de concentrações (baixa, média e alta) na faixa de trabalho. O documento estabelece diferentes critérios para aceitação de repetibilidade, dependendo do percentual de analito.

ii. Para precisão intermediária, as análises são realizadas sob condições determinadas, podendo variar os analistas, os equipamentos ou os tempos (geralmente realizando análises em intradia e interdía). Os cálculos utilizados para as diferenciações estão dispostos no documento do Inmetro.

iii. A reprodutibilidade diz respeito a análises realizadas em diferentes laboratórios, comparando e verificando os desempenhos. O documento estabelece diferentes critérios para aceitação de reprodutibilidade, dependendo do percentual de analito.

1.5.6 Seletividade

A seletividade se refere à capacidade do método em quantificar o analito na presença de outros analitos, outras matrizes ou outros possíveis interferentes. Quando o método expressa essa capacidade, é chamado de seletivo. Para tal, o documento sugere ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o analito, além de avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolvimento de método eletroanalítico para detecção do fungicida Tiabendazol em amostras de suco de uva integral (nacional) sobre eletrodo de DDB, a partir da extração e da concentração por ponto nuvem, e separação com cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2.2 Objetivos Específicos

- i. Caracterização eletroquímica do fungicida Tiabendazol por meio de Voltametria Cíclica e Voltametria de Pulso Diferencial;
- ii. Obtenção das melhores condições na metodologia de extração e pré-concentração do fungicida Tiabendazol, por ponto nuvem em amostras de suco de uva integral;
- iii. Obtenção das melhores condições na metodologia de separação e detecção do fungicida Tiabendazol, extraído e pré-concentrado por ponto nuvem em amostras de suco de uva integral, utilizando CLAE-EC com eletrodo de trabalho de DDB;
- iv. Validação de metodologia que combina EPN e CLAE-EC, investigando a seletividade, a sensibilidade, a exatidão, a precisão, a linearidade e a faixa linear de trabalho, LD e LQ.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Pré-tratamento do eletrodo de DDB

Antes de realizar as medidas analíticas, tanto para caracterização eletroquímica do Tiabendazol (TBZ) como para detecção eletroquímica em CLAE-EC, o eletrodo de DDB (área exposta de $0,32 \text{ cm}^2$) foi submetido a um pré-tratamento catódico. Quando utilizado pela primeira vez, o eletrodo deve passar por tratamento anódico por 60 s e em seguida pelo catódico por 300 s. Nas demais, realiza-se o pré-tratamento anódico por 30 s (limpeza) e catódico por 150 s. Para isso, foi utilizada uma densidade de corrente de $1,0 \text{ A cm}^{-2}$, em solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e placa de platina como contra eletrodo, para todos os pré-tratamentos.

Uma vez realizado o pré-tratamento do eletrodo, o mesmo foi submetido a uma varredura de 40 ciclos de VC em tampão fosfato $0,01 \text{ mol/L}$ (pH 7,0), com velocidade de varredura de 250 mV/s , na faixa de 0 a $2,0 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol/L}$). Após esse procedimento, as caracterizações eletroquímicas eram devidamente realizadas. Em seguida, foi realizada uma VC no intervalo de potencial de $0,9 \text{ V}$ a $1,6 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol/L}$) com velocidade de varredura 100 mV s^{-1} gerando um voltamograma (branco).

3.2 Caracterização eletroquímica do Tiabendazol

O estudo do comportamento do TBZ sobre eletrodo de DDB foi realizado a partir do emprego das técnicas de VC e VPD: na faixa de pH de $2,0$ a $11,0$ e em um intervalo de potencial de $0,90 \text{ V}$ a $1,6 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol/L}$). Para essas medidas, foi utilizado o Potenciostato/Galvanostato modelo PGSTAT 128N da AUTOLAB acoplado a um computador com software GPES versão 4.9.

Como eletrólito suporte foi utilizado o tampão fosfato ($0,01 \text{ mol/L}$), preparado pela dissolução de KH_2PO_4 (P.A Synth) em água desionizada (Milli-Q[®]). O pH foi ajustado com NaOH (P.A Synth) e H_3PO_4 (Synth) na concentração de $0,5 \text{ mol/L}$, com auxílio do pHmetro GEAKA PG1800.

A solução estoque ($2,0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$) do fungicida TBZ (Sigma-Aldrich) foi preparada em acetonitrila (J.T. Baker) grau HPLC. A solução foi mantida em abrigo da luz e estocada em refrigerador acerca de 4°C . Antes de cada dia de análise, a solução foi submetida à agitação ultrassônica (20 kHz) para dissolução dos cristais formados pela refrigeração.

3.3 Célula Eletroquímica

Uma célula eletroquímica convencional foi utilizada para as medidas voltamétricas e apresenta três componentes: A) Eletrodo de trabalho (DDB), B) Eletrodo de referência de Ag/AgCl (3,0 mol/L) e C) Contra-eletródo de platina. A [Figura 5](#) mostra a fotografia da célula utilizada:



Figura 5: Célula eletroquímica utilizada para as medidas voltamétricas, com eletrodo de trabalho (A), eletrodo referência (B) e contra-eletródo (C). Ao lado, o eletrodo de trabalho desmontado, apresentando a forma de contato elétrico e a alocação do DDB (1 cm²).

3.4 Voltametria Cíclica e Voltametria de Pulso Diferencial

Para VC, foi empregada uma faixa de varredura no intervalo de 0,9 a 1,6 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L) com velocidade de varredura 100 mV s⁻¹. Em cada medida, 200 μ L da solução padrão de TBZ ($2,0 \times 10^{-3}$ mol/L) eram adicionados aos 40 mL de eletrólito suporte (tampão fosfato 0,01 mol/L) contidos na célula eletroquímica, resultando em uma concentração final de $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L (ou 2,0 mg/L).

Para VPD, o intervalo de potencial foi ajustado de 0,75 V a 1,5 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L), com aplicação de amplitude de 50 mV, escada de potencial 5 mV e velocidade de varredura de 50 mV/s (5 mV a cada 0,1 s). Em cada medida, 200 μ L da solução padrão de TBZ ($2,0 \times 10^{-3}$ mol/L) eram adicionados aos 40 mL de eletrólito suporte (tampão fosfato 0,01 mol/L) contidos na célula eletroquímica, resultando em uma concentração final de $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L (ou

2,0 mg/L). Após adição do analito à célula eletroquímica, aplicava-se uma agitação magnética por 120 s, e aguardava-se 40 s entre as medidas em triplicata.

3.5 EPN

Amostras de suco de uva integral branco (produzidas por variedades da uva verde) foram ajustadas para pH 7,0 com NaOH e HCl (o pH inicial variava entre 3,10 a 3,20). Alíquotas de 10 mL de cada suco foram separadas e a elas foram adicionados 50 µL do padrão TBZ ($2,0 \times 10^{-3}$ mol/L) e 1,0 mL da solução de Tergitol TMN 6 20% m/m (Sigma-Aldrich), sendo deixadas sob agitação manual. Em seguida, as amostras foram submetidas a aquecimento em banho termostático a 36°C e agitação ultrassônica (20 kHz) por 15 min. Ao final, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 min e a fase rica em surfactante foi, então, retirada com auxílio de micropipeta.

3.6 Obtenção das melhores condições de análise por CLAE-EC

Para separação e análise dos compostos extraídos, utilizou-se um cromatógrafo da marca Agilent Technologies modelo 1220 Infinity LC (modelo G4288B), composto por um loop de injeção de amostra de 20 µL e detector UV-VIS. A coluna cromatográfica usada foi do tipo C8 (Luna[®], 10 µm, 120 Å) com faixa de trabalho entre pH de 2 a 8. Como eluentes da fase móvel (FM) foram utilizados acetonitrila (J.T. Baker) e tampão fosfato 0,01 mol/L em pH 7,0 (escolhido a partir do estudo prévio por VPD). As leituras eletroquímicas foram feitas por meio do potenciostato PGSTAT 128N. A [Figura 6](#) mostra o sistema de CLAE-EC usado neste trabalho:

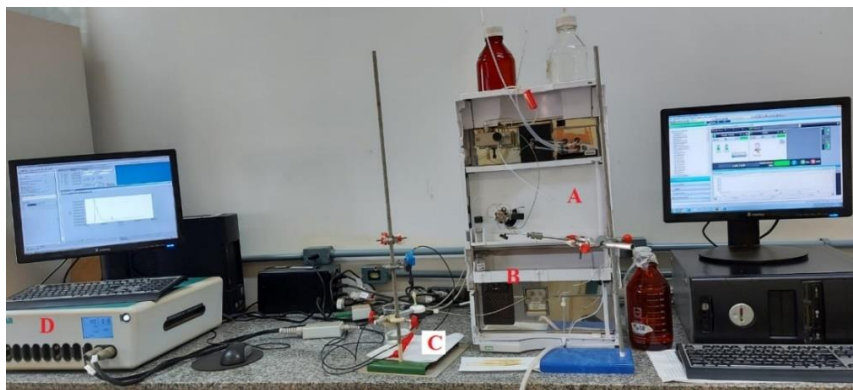


Figura 6: Equipamento de CLAE-EC utilizado para separação e detecção eletroquímica, A) Cromatógrafo/CLAE, B) Saída do detector UV-VIS, C) Detector eletroquímico e D) Potenciostato.

As medidas amperométricas foram realizadas em uma célula de fluxo especialmente projetada para este fim ([Figura 7](#)). Ela é composta por dois blocos de Teflon[®], os quais são encaixados por rosqueamento. No seu interior, é colocado o eletrodo de trabalho DDB, que possui vedação por um anel de silicone em sua parte superior e conexão elétrica na parte inferior. Um tubo de aço inox funciona como canal de saída da célula e contra-eletrodo. O eletrodo de referência Ag/AgCl (3,0 mol/L) é conectado na célula por meio de uma fenda, a qual fica posicionada logo acima do eletrodo de DDB.

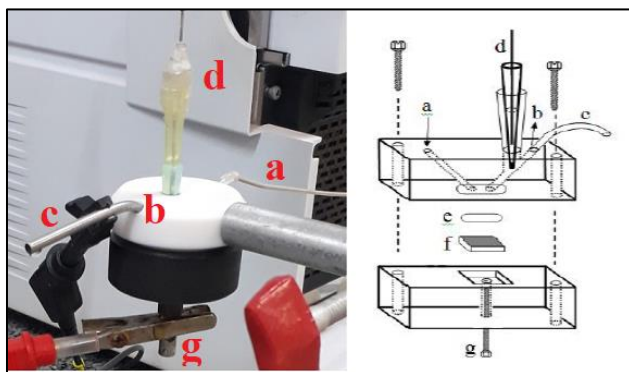


Figura 7: Célula eletroquímica acoplada à saída do equipamento de CLAE e sua representação esquemática: a) entrada da célula, b) saída da célula, c) tubo de aço inox, d) ER Ag/AgCl (3,0 mol/L), e) anel de silicone, f) eletrodo de DDB e g) contato elétrico (Fonte: Adaptado de Andrade *et al.* (2009)).

As condições cromatográficas estudadas partiram do trabalho de Caixeta-Neta (2019), uma vez que a autora realizou o estudo da separação do analito TBZ de matriz real (tomate). Os parâmetros investigados foram a composição da fase móvel (TF:ACN), a vazão e o potencial aplicado.

Em relação à fase móvel, foram variadas as proporções de tampão fosfato (TF) e acetonitrila (ACN) da seguinte forma: 57:43, 59:41, 61:39, 63:37, 65:35, 67:37, 69:31 e 70:30. O potencial aplicado foi de 1,35 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L). A amostra pré-concentrada a partir do EPN foi diluída na relação 1:1 (V:V) com os solventes utilizados na fase móvel (50 μ L da amostra: 50 μ L fase móvel), seguindo a mesma proporção dos componentes dela, tal como apresentado na [Tabela 4](#).

Tabela 4: Preparação de amostras com eluentes, TF e ACN para injeção.

Fase Móvel		Diluição da Amostra		
Tampão (%)	ACN (%)	Extrato (μL)	Tampão (μL)	ACN (μL)
57	43	50	28,5	21,5
59	41	50	29,5	20,5
61	39	50	30,5	19,5
63	37	50	31,5	18,5
65	35	50	32,5	17,5
67	33	50	33,5	16,5
69	31	50	34,5	15,5
70	30	50	35	15

Em relação ao estudo da vazão, as condições empregadas foram 1,0 mL/min, 1,1 mL/min, 1,2 mL/min, 1,3 mL/min e 1,4 mL/min, na proporção 69:31 (TF:ACN) e potencial de 1,35 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L).

Após obtenção das melhores condições cromatográficas, realizou-se a determinação do potencial de melhor resposta de corrente (voltamograma hidrodinâmico), aplicando-se a técnica de detecção por múltiplos pulsos na faixa de 1,15 V - 1,45 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L), com variação entre pontos de 50 mV, na vazão de 1,2 mL/min e proporção de fase móvel 69:31 (TF:ACN). Todos os ensaios realizados para obtenção das melhores condições da CLAE-EC partiram de adequações da condição otimizada de EPN apresentada no trabalho de Caixeta-Neta (2019), como descrito na [seção 3.5](#). A obtenção das melhores condições dessa técnica foi realizada posteriormente, conforme descrito a seguir.

3.7 Obtenção das melhores condições da EPN

Para obtenção das melhores condições da EPN, foram realizados ensaios univariados, tendo o pH da amostra, a adição de sal NaCl, a temperatura, o tempo de agitação ultrassônica e a concentração do surfactante Tergitol TMN 6 (m/m) como fatores investigados.

Primeiramente, foi avaliado o comportamento da extração na presença (0,4 g) e ausência de NaCl, uma vez que este parecia ser o fator determinante nos ensaios realizados com suco de uva integral branco. Esses ensaios foram realizados em paralelo com alteração da temperatura, do seguinte modo: 1) EPN, com adição de sal (0,6 g) e aquecimento a 36°C e agitação ultrassônica de 15 min, 2) EPN, com adição de sal (0,6 g), sem aquecimento (27°C) e agitação ultrassônica de 15 min, 3) EPN, sem adição de sal e com aquecimento a 36°C e agitação ultrassônica de 15 min e 4) EPN, sem adição de sal e sem aquecimento (27°C) e agitação ultrassônica de 15 min.

Definidos os parâmetros de adição de sal e temperatura de extração, foi avaliado o fator pH. O pH foi variado entre 2,0 e 11,0, adotando-se a temperatura ambiente (27°C), sem adição de sal e agitação ultrassônica (20kHz) de 15 min.

Posteriormente, foram feitos ensaios variando-se a concentração do surfactante (em termos percentuais, m/m) na faixa de 5% a 30%, mantendo-se a temperatura ambiente, sem adição de sal, em pH 6,0 e 15 min de agitação ultrassônica. Finalizou-se esta etapa mantendo-se os mesmos valores anteriormente descritos, mas variando-se o tempo de agitação ultrassônica de 1 min a 60 min.

3.8 Validação do método

3.8.1 Limite de Quantificação e Detecção

Para validação do método, os LQ e LD foram os primeiros a ser identificados, utilizando-se, respectivamente, a relação Sinal/Ruído 10:1 e 3:1, obtidas a partir da relação entre o sinal obtido no ensaio de extração do TBZ e do ruído no branco da amostra.

3.8.2 Curva com EPN e sem EPN: metodologia

A curva com extração do TBZ foi feita na faixa de 0,18 µmol/L a 7,5 µmol/L (36,2 µg/L a 1,5 mg/L). Já a curva sem extração, foi feita utilizando-se a faixa de 2,0 µmol/L a 112,5 µmol/L (0,4 mg/L a 22,6 mg/L), sem EPN. O analito foi adicionado a partir da solução estoque de $2,0 \times 10^{-3}$ mol/L.

3.8.3 *Exatidão, Precisão e Seletividade*

Conforme apresentado na [seção 1.5](#), a exatidão do método foi avaliada em relação à repetibilidade e à precisão intermediária, com ensaios de adição de Tiabendazol em suco de uva branco em três níveis (0,25 mg/L, 0,76 mg/L e 1,26 mg/L), em triplicata, em três dias diferentes. A recuperação foi obtida a partir da curva analítica. Os parâmetros de aceitabilidade do método foram discutidos relativos aos documentos apresentados pela Comissão Europeia e ANVISA, SANTE/2017/11813 (01 de janeiro de 2020) e Resolução-RE n° 899 (29 de maio de 2003), respectivamente, uma vez que também estabelecem critérios para agrotóxicos em matrizes alimentares.

A seletividade foi avaliada a partir da comparação entre os cronoamperogramas e os cromatogramas da amostra com e sem analito, e do padrão em solvente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Comportamento do TBZ sobre superfície do DDB

A técnica da VC apresenta dados qualitativos para a compreensão do comportamento do analito em diferentes condições e sua resposta perante o eletrodo. A [Figura 8](#) apresenta o comportamento do TBZ na faixa de pH de 2,0 a 10,0 (TF 0,01 mol/L):

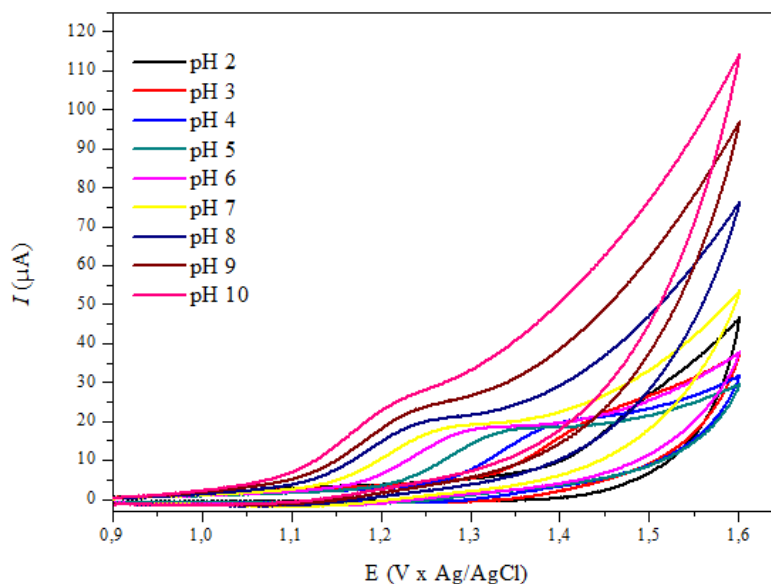


Figura 8: Voltamogramas cíclico do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em diferentes pH, faixa de potencial de 0,9 V a 1,6 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L), $\nu = 100$ mV/s e eletrólito suporte TF (0,01 mol/L).

A técnica de VC permite identificar a capacidade do analito em oxidar (com aumento do potencial – sentido anódico) e reduzir (com diminuição do potencial – sentido catódico). Analisando os voltamogramas de forma isolada, percebe-se que o TBZ apresenta apenas um pico no intervalo investigado, sendo ele anódico. Ou seja, quando é realizada a varredura no sentido do aumento de potencial, ele é oxidado na superfície do eletrodo, mas no sentido reverso não se reduz na superfície do mesmo, caracterizando, portanto, um processo irreversível (SKOOG *et al.*, 2006). Em relação à variação de pH e sua interferência no meio, a medida em que o pH aumenta o pico referente à oxidação do TBZ (potencial de pico anódico – E_{pa}) é deslocado para regiões menos anódicas. Ou seja, o analito se oxida com maior facilidade à medida que o pH aumenta. Essa característica pode ser confirmada pelos voltamogramas de pulso diferencial obtidos em diferentes pH, mostrados na [Figura 9](#).

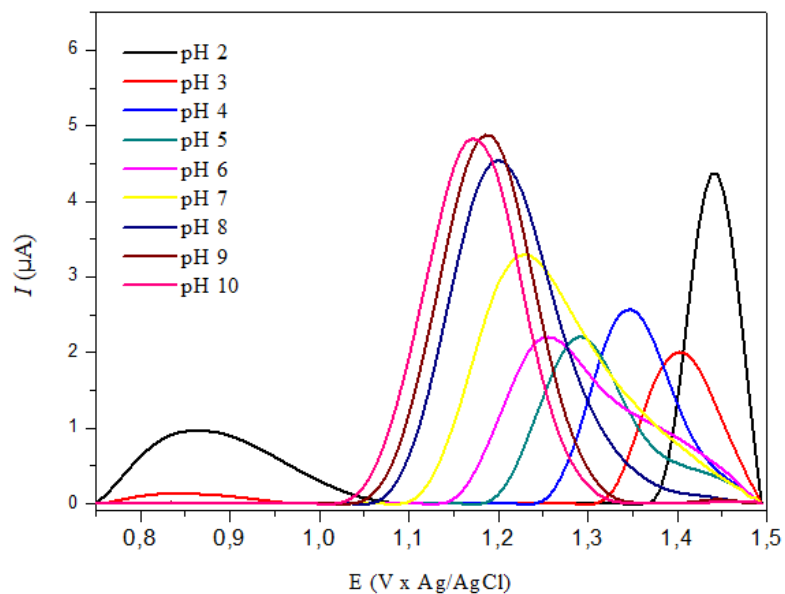


Figura 9: Voltamogramas de pulso diferencial do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em diferentes pH, na faixa de potencial de 0,75 V a 1,5 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L). $a = 50$ mV, escada de potencial = 5 mV e $v = 50$ mV/s.

A Figura 9 mostra a formação de picos de oxidação bem definidos na faixa de pH investigada. As relações entre a corrente de pico anódico (I_{pa}) e o E_{pa} com o pH podem ser melhor visualizados a partir da [Figura 10](#).

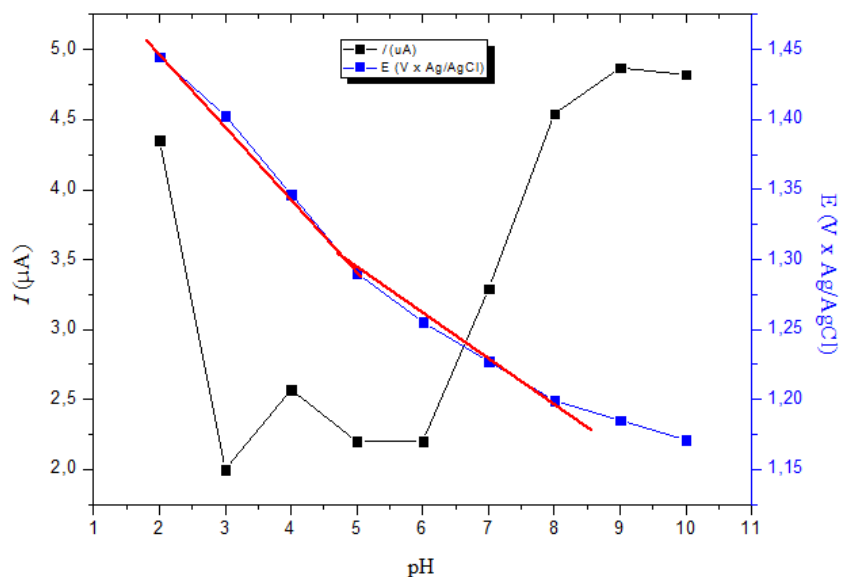


Figura 10: Relação entre os valores de I_{pa} e E_{pa} com o pH (faixa de 2,0 a 10), obtidos a partir do VPD da Figura 9.

De acordo com os resultados apresentados na [Figura 10](#), verifica-se que o E_{pa} se desloca para valores menos positivos na medida em que o pH da solução aumenta. Além disso, as relações lineares observadas em específicas faixas de pH indicam haver participação de um número de prótons e elétrons que, por sua vez, será função da inclinação da reta obtida (comportamento Nernstiano). A [Figura 11](#) mostra o diagrama de distribuição de espécies em função do pH, bem como as estruturas químicas das espécies formadas em diferentes valores de pH.

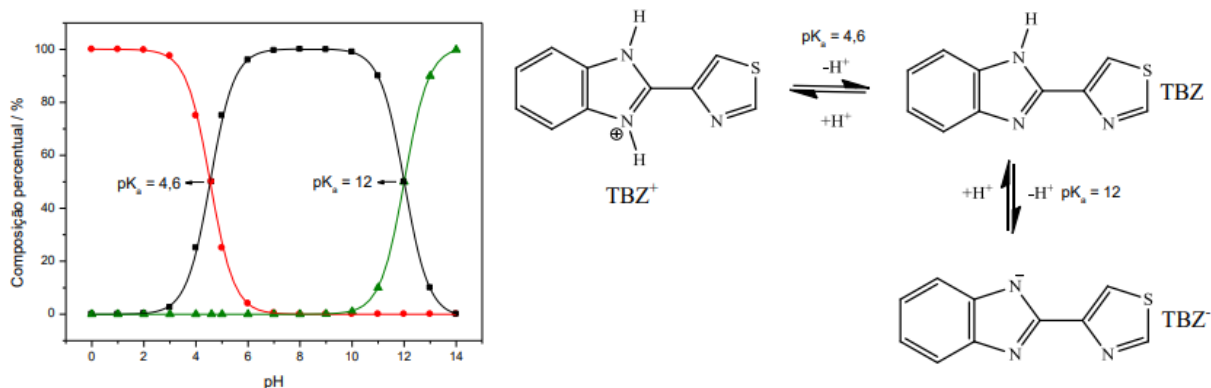


Figura 11: Frações das espécies do TBZ em função do pH e mecanismo de protonação e desprotonação (Fonte: Adaptado de Caixeta-Neta (2019)).

De acordo com a [Figura 11](#), o TBZ se encontra, majoritariamente, na forma protonada TBZ^+ até as proximidades do pH 4,0. No intervalo de $5,0 < \text{pH} < 12$ a espécie majoritária é o TBZ na sua forma neutra e, então, em valores de pH acima de 12,0 a forma majoritária é TBZ^- (JALIL *et al.*, 2014; FERREIRA, 2018). O segundo pKa da molécula de TBZ não foi detectado, uma vez que as medidas não foram realizadas acima do pH 10.

As reações de protonação e desprotonação implicam no potencial (e nos elétrons participantes) necessário para oxidação das espécies presentes no meio. Os resultados deste trabalho estão condizentes com a presença de pelo menos três espécies. A mudança de inclinação de reta ($E_p \times \text{pH}$) próxima de pH 5,0, observada na [Figura 10](#), pode ser atribuída ao primeiro pKa da molécula TBZ (4,6). A partir de pH 8,0 a inclinação diminui ainda mais e o potencial de pico (E_p) parece deixar de ser dependente do pH, indicando que a partir deste pH o E_p não é mais afetado pela concentração de íons H^+ , sugerindo a ausência de qualquer etapa de protonação no mecanismo de oxidação, como também observado por Caixeta-Neta *et al.* (2020) e Ribeiro (2014). De pH 2,0 a 5,0 o coeficiente angular é de 50 mV/pH (indicando uma participação

praticamente igual entre número de prótons e elétrons), e de 5,0 a 8,0 é de 33 mV/pH (com maior participação de prótons).

A diminuição da corrente de pico com o aumento do pH (até ~pH 6 com alguma oscilação) aponta para uma diminuição na cinética de transferência de carga (RIBEIRO, 2014). O gráfico da relação entre corrente de pico e pH ($I_{pa} \times \text{pH}$), [Figura 10](#), mostra que as espécies que apresentam maior atividade eletroquímica encontram-se em meio mais ácido (onde a espécie TBZ^+ é majoritária – ver [Figura 11](#)) e em meio mais alcalino (onde a espécie TBZ é majoritária – ver [Figura 11](#)).

A escolha da melhor condição para se trabalhar com o TBZ por CLAE-EC deve ser feita considerando-se não somente o melhor sinal de corrente, mas também a faixa segura de trabalho na coluna cromatográfica C8 (que é de pH 2,0 a 8,0). A condição mais adequada selecionada para se trabalhar com a associação das duas técnicas é em pH 7,0, pois nessa condição evita-se qualquer risco à integridade do sistema cromatográfico, além do sinal eletroquímico de oxidação do TBZ ser maior na faixa de trabalho possível. Ainda que as condições de pH 2,0 e 8,0 estejam dentro da faixa de trabalho, elas foram consideradas extremas para o sistema cromatográfico e, portanto, descartadas.

4.2 CLAE-EC

O emprego da técnica de CLAE em associação à detecção eletroquímica (CLAE-EC) tem por objetivo permitir a análise individual do analito a partir da separação dos possíveis interferentes presentes na matriz de análise. Assim, a condição mais adequada é aquela que apresenta o maior sinal de corrente do analito obtida a partir de picos com boa definição e linha de base. A [Figura 12](#) mostra o primeiro estudo relativo à composição da fase móvel ([seção 3.6](#)), no qual são investigadas diferentes proporções de fase móvel, TF:ACN.

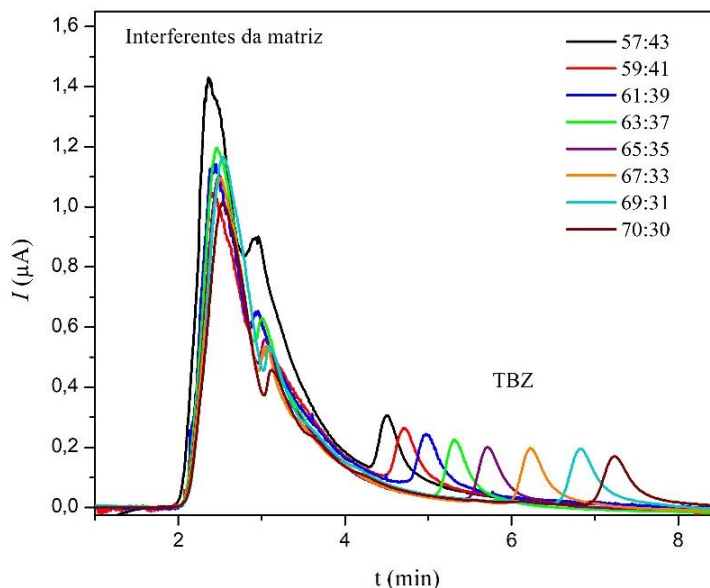


Figura 12: Cronoamperograma referente ao estudo da composição da fase móvel após EPN (pH 7,0, 50 μL de TBZ $2,0 \times 10^{-3}$ mol/L, 36°C , Tergitol TMN 6 20% m/m e 15 min de agitação ultrassônica). FM = TF (pH 7,0):ACN (V/V), vazão de 1,0 mL/min. $E = 1,35 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

Por meio dos resultados da [Figura 12](#) é possível observar que o aumento da proporção de tampão promoveu melhor separação entre os componentes da matriz e o TBZ, com sinal de corrente relativamente estável entre as proporções TF:ACN 65:35 e 70:30. A composição da fase móvel na qual a proporção de ACN é atenuada proporciona redução da força da fase móvel perante coluna reversa C8, que, neste caso, resulta na melhor separação entre os interferentes da matriz e o analito TBZ. Desse modo, foi escolhida a composição de fase móvel 69:31, por já garantir uma boa separação entre analito e matriz, com melhor sinal de corrente.

Em seguida, a vazão da fase móvel ([Figura 13](#)) foi variada para maiores valores (1,0 mL/min, 1,2 mL/min, 1,3 mL/min e 1,4 mL/min) com o objetivo de melhorar o sinal de corrente em função do aumento do transporte de massa do analito em direção à superfície do eletrodo proporcionado pelo aumento deste parâmetro. Como esperado, o aumento da vazão proporcionou tanto aproximação entre interferentes da matriz e analito, quanto melhor definição e aumento nos sinais de corrente. Foi observada também a formação de bolhas na superfície do eletrodo com aumento da vazão a partir de 1,3 mL/min, causando instabilidade nos sinais eletroquímicos registrados. Portanto, a vazão de 1,2 mL foi a condição que proporcionou melhor combinação de sinal, separação de componentes e estabilidade.

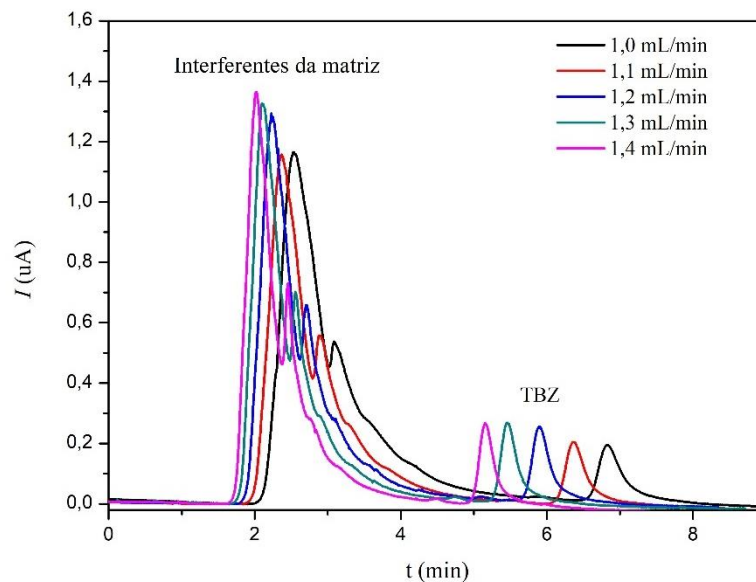


Figura 13: Cronoamperograma do estudo da vazão da fase móvel após EPN (pH 7,0, 50 μ L de TBZ $2,0 \times 10^{-3}$ mol/L, 36°C, Tergitol TMN 6 20% m/m e 15 min de agitação ultrassônica). FM = TF (pH 7,0):ACN de 69:31 (V/V), eletrodo de trabalho DDB, $E = 1,35 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

4.3 Voltamograma Hidrodinâmico

Uma vez obtidas as melhores condições cromatográficas, foi realizado o estudo do melhor potencial aplicado para detecção a partir da obtenção de um voltamograma hidrodinâmico com aplicação do método de múltiplos pulsos. Para isso, foram aplicados potenciais na faixa de 1,15 V a 1,45 V \times Ag/AgCl. Os resultados dessas medidas estão mostrados na [Figura 14](#):

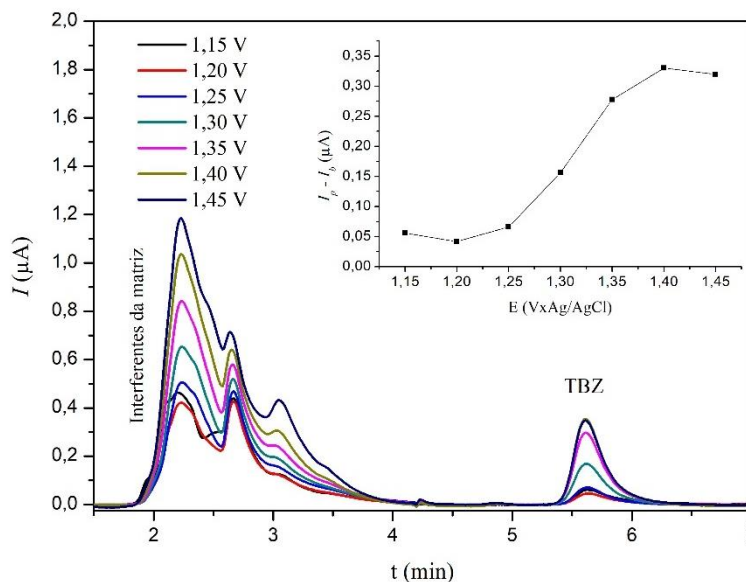


Figura 14: Voltamograma hidrodinâmico após EPN (pH 7,0, 50 μ L de TBZ $2,0 \times 10^{-3}$ mol/L, 36°C, Tergitol TMN 6 20% m/m e 15 min de agitação ultrassônica) e relação entre $I_{pico} - I_{base} \times E$ (Figura inserida). FM = 69:31 (TF pH 7,0:ACN) e vazão = 1,2 mL/min.

Os dados obtidos pelo voltamograma hidrodinâmico mostrado na [Figura 14](#) e os da relação entre $I_{pico} - I_{base} \times E$ (Figura inserida) permitem observar uma tendência crescente entre os dois fatores, atingindo um patamar de sinal de corrente em $1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$ (3,0 mol/L). Quanto maior o potencial aplicado, maior é a taxa de oxidação das espécies de TBZ sobre a superfície do eletrodo. Também, em potenciais mais elevados, a reação de desprendimento de oxigênio (RDO) proveniente da oxidação eletroquímica da água passa a ser mais presente, resultando na ocupação dos sítios ativos da superfície do eletrodo. O uso de eletrodos com grandes janelas de potencial, tal como o DDB, minimiza o efeito de competição entre a oxidação do analito e da água. No potencial de $1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$ (3,0 mol/L) observa-se que o sinal de oxidação do TBZ atinge um patamar, com um ligeiro decréscimo acima deste valor. Assim, o potencial $1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$ (3,0 mol/L) foi selecionado para detecção do TBZ sobre eletrodo DDB.

A distinção entre os picos relacionados aos interferentes da matriz e do TBZ foram ilustrados nas Figuras [15](#) e [16](#), para detecção eletroquímica e UV-VIS, respectivamente, nas melhores condições cromatográficas. Esses resultados mostram, portanto, parte da capacidade seletiva do método, uma vez que a outra depende da EPN.

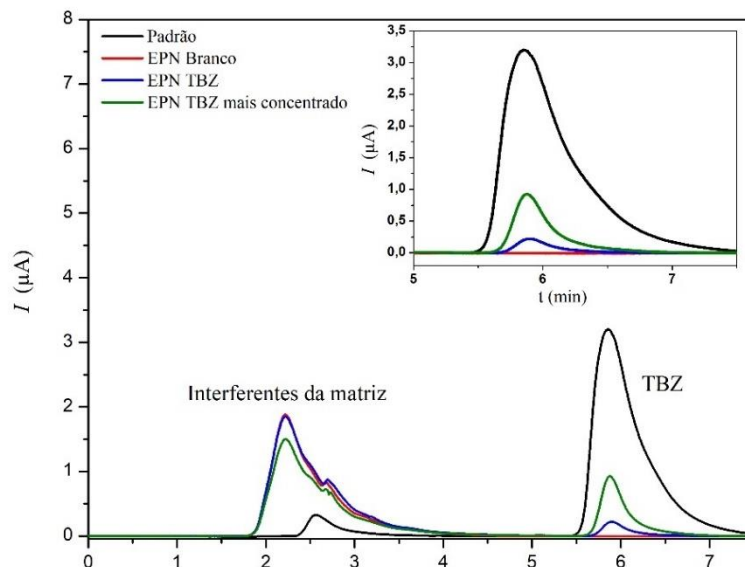


Figura 15: Cronoamperograma da detecção do TBZ extraído por EPN da matriz de suco de uva integral branco, sem TBZ (curva em vermelho), com TBZ (curva em azul), e mais concentrado (curva em verde). Na figura inserida, está o sinal dos picos do TBZ. Todos na proporção 50 μ L extrato: 50 μ L eluente, e o que adicionou-se +10 μ L da solução TBZ padrão ($2,0 \times 10^{-3}$ mol/L). FM = 69:31 (TF pH 7,0:ACN), vazão de 1,2 mL/min e $E = 1,40$ V \times Ag/AgCl.

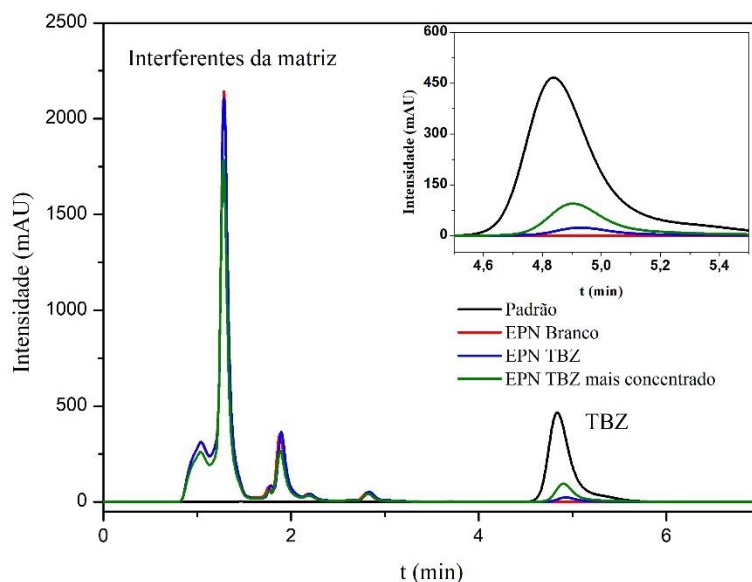


Figura 16: Cromatograma da detecção TBZ extraído por EPN da matriz de suco de uva integral branco, sem TBZ (curva em vermelho), com TBZ (curva em azul), e mais concentrado (curva em verde). Na figura inserida, está o sinal dos picos do TBZ. Todos na proporção 50 μ L extrato: 50 μ L eluente, e o que adicionou-se +10 μ L da solução TBZ padrão ($2,0 \times 10^{-3}$ mol/L). FM = 69:31 (TF pH 7,0:ACN), vazão de 1,2 mL/min, detecção por UV-VIS ($\lambda = 274$ nm).

4.4 Obtenção das melhores condições para EPN

Conforme apresentado na revisão bibliográfica, alguns fatores interferem no processo de Extração por Ponto Nuvem, promovendo melhor interação surfactante-analito e surfactante-surfactantes, sendo eles: temperatura de extração (referente ao ponto nuvem), pH do meio, adição de dessecantes (sais ou álcoois) e concentração do surfactante (concentração micelar crítica).

De modo geral, a primeira etapa em uma EPN é a obtenção do melhor pH para extração, já que diz respeito à ionização do analito. Isso também é feito para processos nos quais o surfactante utilizado é do tipo não ionizável. Aqui, esse processo não foi o primeiro a ser avaliado, uma vez que, durante os processos de obtenção das melhores condições cromatográficas, a etapa de adição de sal provocava algum efeito negativo na extração.

Portanto, tomou-se como prioridade identificar o efeito da adição de sal no processo de EPN. A extração prevê a utilização de aquecimento, para provocar maior interação entre surfactante-analito e surfactante-surfactante, até que se atinja o que se chama de ponto nuvem (temperatura ideal, para cada surfactante, relacionada à formação da fase rica em surfactante). Como exposto na revisão bibliográfica, o sal é utilizado na Extração por Ponto Nuvem como um dessecante, retirando moléculas de água entre as micelas do surfactante, favorecendo a formação da fase rica em surfactante e, assim, a temperatura de ponto nuvem.

Por meio de testes univariados foram avaliados: 1) EPN, com adição de sal (0,6 g) e aquecimento 36°C (agitação ultrassônica de 15 mins), 2) EPN, com adição de sal (0,6 g), sem aquecimento, 27°C (agitação ultrassônica de 15 min), 3) EPN, sem adição de sal e com aquecimento 36°C (agitação ultrassônica de 15 min), 4) EPN, sem adição de sal e sem aquecimento, 27°C (agitação ultrassônica de 15 min). Nos testes que envolveram adição de sal (1 e 2), houve rompimento de micelas, sem possibilidade de injeção no cromatógrafo, restando as análises sem sal (3 e 4). Nessas, foi observada uma diferença mínima ([Figura 17](#)), favorecendo a utilização da EPN sem aquecimento.

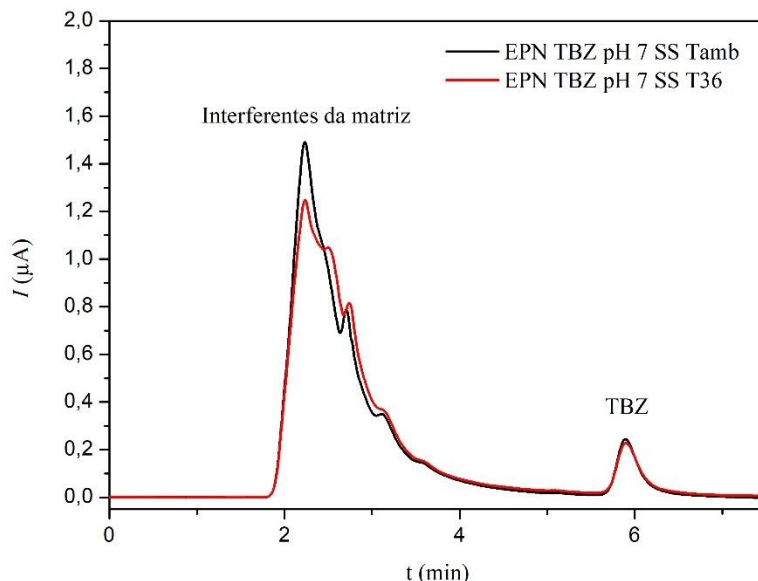


Figura 17: Cronoamperograma das variações 3 e 4, relativas à adição de sal e à alteração de temperatura, no processo de obtenção das melhores condições da EPN (pH 7,0, 50 μL de TBZ $2,0 \times 10^{-3}$ mol/L, 15 min de agitação ultrassônica, 20% de solução Tergitol TMN 6 m/m). FM = 69:31 (TF pH 7,0:ACN), eletrodo de trabalho DDB, vazão = 1,2 mL/min e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

A explicação obtida para esse efeito está na matriz. Como discutido previamente ([seção 1.2.2](#)), a uva é rica em sais minerais, principalmente quando se leva em conta as suas sementes. O processo de produção do suco de uva integral consiste na trituração e no aquecimento das uvas, sem passar por um processo prévio de separação por partes, o que elevaria o teor de sais minerais neste produto. Portanto, já que a matriz é rica em sais minerais, a ação de adicionar mais sal faz com que a temperatura de ponto nuvem (36°C para o Tergitol TMN 6) caia a ponto de romper as micelas. Assim, definiu-se uma EPN sem adição de sal e sem aquecimento (feito em temperatura ambiente, 27°C).

Como visto, o pH na Extração por Ponto Nuvem é utilizado para facilitar a interação entre analito e surfactante e dificultar a interação entre analito e matriz. Uma vez que o suco de uva tem grande quantidade de água em sua matriz, o pH que proporciona maior proporção de TBZ neutro (característica apolar) provoca um aumento da interação entre este e o surfactante. Esse efeito pode ser observado na [Figura 18](#) e confirmado na [Figura 19](#) indicando um patamar no gráfico de $I_p - I_b$ (μA) x pH para pH 6,0, demonstrando maior extração nesse meio (que está em conformidade com o diagrama de espécies destacado anteriormente, na [Figura 11](#)).

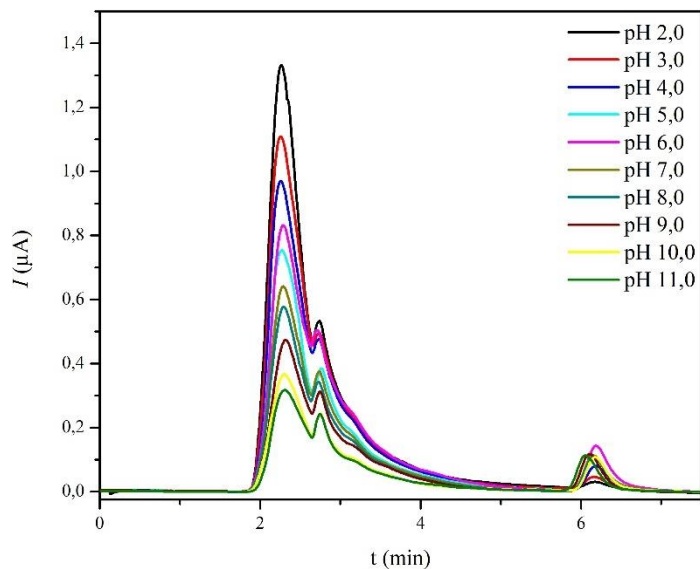


Figura 18: Cronoamperograma da variação de pH no processo de obtenção das melhores condições da EPN (50 μL de TBZ $2,0 \times 10^{-3}$ mol/L, 27°C , adição de solução de Tergitol TMN 6 20% m/m em 15 min de agitação). FM = 69:31 (TF pH 7,0:ACN), vazão = 1,2 mL/min e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

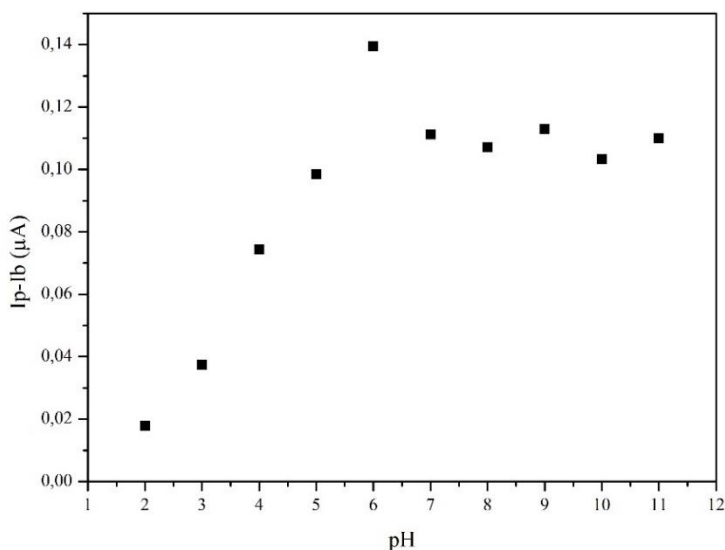


Figura 19: Relação entre $I_{p-ibase} \times \text{pH}$, no processo de obtenção das melhores condições da EPN (50 μL de TBZ $2,0 \times 10^{-3}$ mol/L, 27°C , adição de solução de Tergitol TMN 6 20% m/m em 15 min de agitação ultrassônica). FM = 69:31 (TF pH 7,0:ACN), vazão = 1,2 mL/min e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

Excluídos os interferentes para EPN na amostra e obtendo-se o melhor pH para determinação do TBZ, há ainda a concentração de surfactante, que também tem efeito direto na extração e pré-concentração do analito. Na [Figura 20](#) são apresentados os cronoamperogramas de todos os ensaios testados para variação do percentual de surfactante adicionado, destacando-se em vermelho aquele em 10%. Para essa confirmação, foi construído um gráfico do tipo $I_p-I_b \times \%$

de surfactante ([Figura 21](#)). Entende-se que, quanto maior é o sinal de detecção (pico de I) do TBZ nesse tipo de gráfico, maior será sua pré-concentração. E, segundo a análise realizada, a extração utilizando solução de 10% de surfactante, dentre a faixa estudada (5% a 30%), foi a que apresentou maior eficiência.

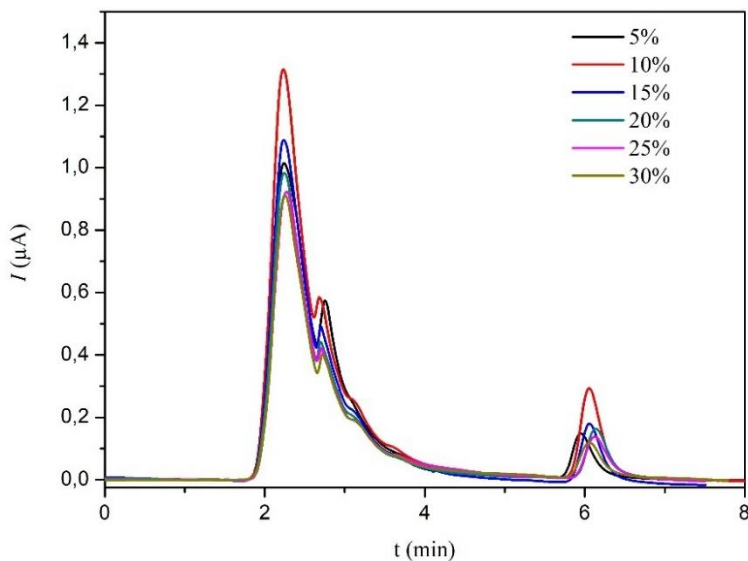


Figura 20: Cronoamperograma da variação concentração do surfactante Tergitol TMN 6 no processo de obtenção das melhores condições da EPN (pH 6,0, 50 µL de TBZ $2,0 \times 10^{-3}$ mol/L, 27°C e 15 min de agitação ultrassônica). FM = 69:31 (TF pH 7,0:ACN), vazão = 1,2 mL/min e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

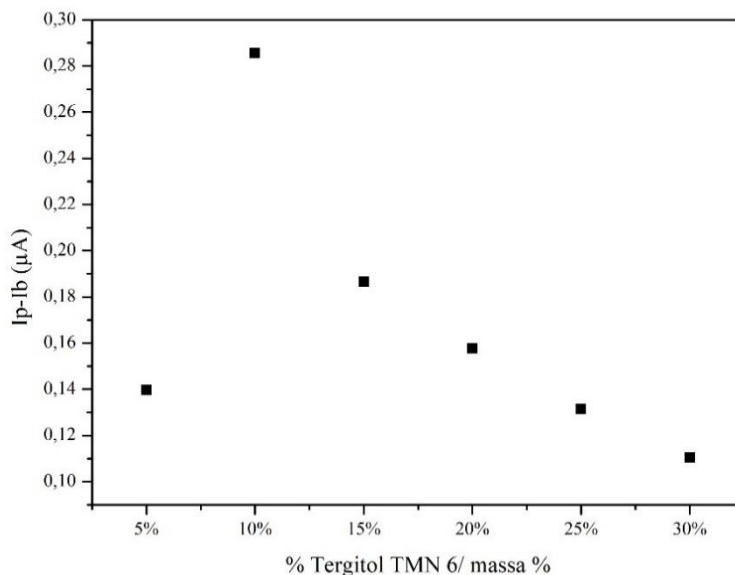


Figura 21: Relação entre $I_{pico-I_{base}} \times \%$ (m/m) da concentração do surfactante Tergitol TMN 6 no processo de obtenção das melhores condições da EPN (pH 6,0, 50 µL de TBZ $2,0 \times 10^{-3}$ mol/L, 27°C e 15 min de agitação ultrassônica). FM = 69:31 (TF pH 7,0:ACN), vazão = 1,2 mL/min e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

Em seguida, foi avaliado o tempo da amostra sob agitação ultrassônica. A agitação ultrassônica, assim como a elevação da temperatura, provoca maior colisão entre moléculas facilitando a formação de micelas ao redor do analito. A [Figura 22](#) demonstra um comportamento de aumento da extração à medida que os ensaios são submetidos a maiores tempos de agitação. Ao relacionar a corrente de pico ($I_p - I_b$) com tempo de agitação ([Figura 23](#)), é possível perceber que o tempo de agitação é fundamental para o processo de EPN, uma vez que o sinal de detecção do TBZ não atinge um patamar e segue com tendência crescente ainda no maior tempo de agitação ultrassônica investigado (60 min).

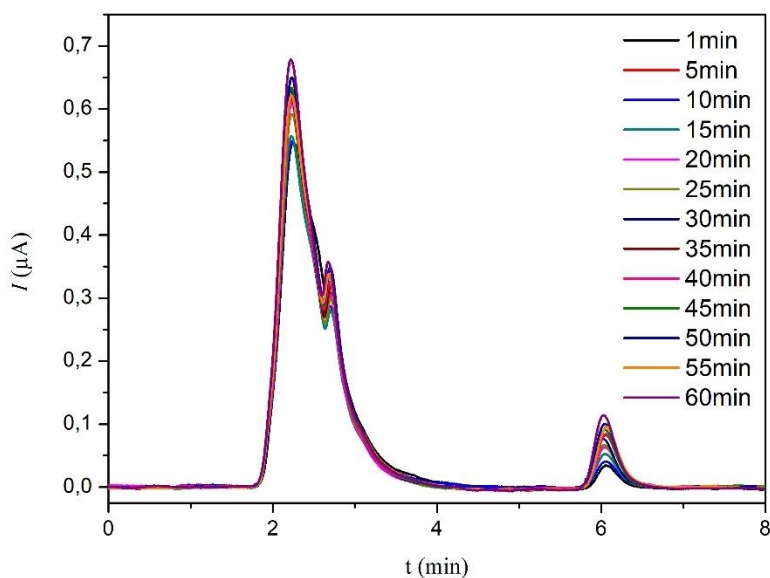


Figura 22: Cronoamperograma da variação do tempo de agitação no processo de obtenção das melhores condições do processo de EPN (pH 6, 50 μL de TBZ $2,0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$, 27°C e adição de 10% da solução de Tergitol TMN 6). FM = 69:31 (TF pH 7,0:ACN), vazão = 1,2 mL/min e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

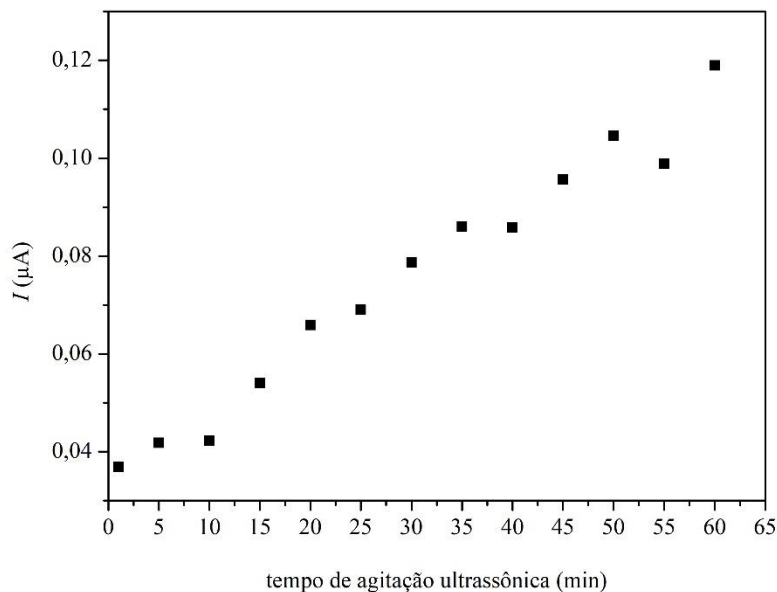


Figura 23: Relação entre $I_{\text{pico}} - I_{\text{base}} \times T$ no processo de obtenção das melhores condições do processo de EPN (pH 6,50 μL de TBZ $2,0 \times 10^{-3}$ mol/L, 27°C e adição de 10% da solução de Tergitol TMN 6). FM = 69:31 (TF pH 7,0:ACN), vazão = 1,2 mL/min e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

Os resultados obtidos no estudo da EPN, referentes à busca pelas melhores condições para tal, apontam para a melhor condição com: temperatura ambiente (27°C) sem adição de sal, adição de 1 mL de Tergitol a 10% (m/m), 60 min de agitação ultrassônica e pH 6,0.

Para avaliação dos resultados obtidos, foi feito um procedimento de validação, identificando os limites de detecção e quantificação, obtenção do fator de pré-concentração, precisão, exatidão intradia e interdia, e aplicação do método em outras marcas de suco de uva branco. Os resultados encontram-se na seção a seguir.

4.5 Validação do método

4.5.1 Limite de detecção e quantificação

Os LD e LQ foram obtidos com a adição do TBZ na amostra e em água, e expostos, respectivamente, aos processos com e sem EPN. Os LD obtidos com e sem EPN foram de $0,0072 \mu\text{mol/L}$ (ou $14,5 \mu\text{g/L}$) e $0,8 \mu\text{mol/L}$ (ou $0,161 \text{ mg/L}$), respectivamente. Os LQ foram de $0,18 \mu\text{mol/L}$ (ou $36,2 \mu\text{g/L}$) e $2,0 \mu\text{mol/L}$ ($0,402 \text{ mg/L}$), na mesma ordem anteriormente citada. A [Figura 24](#) mostra um cronoamperograma obtido na condição de obtenção do LQ após o processo de EPN:

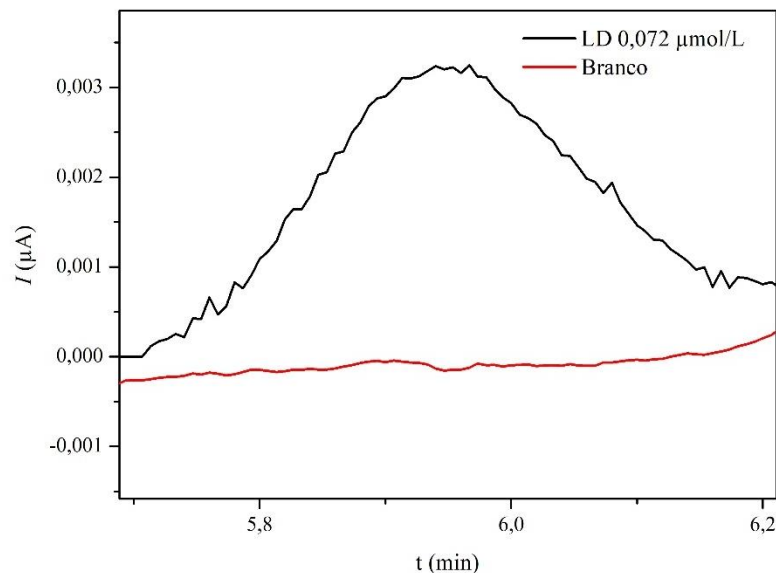


Figura 24: Cronoamperograma obtido para o LD do método para determinação de TBZ em suco integral de uva verde após processo de EPN na melhor condição. FM = TF (0,01 mol L⁻¹, pH 7):ACN na proporção de 69:31 (V/V), volume de injeção de 20 µL e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

4.5.2 Fator de pré-concentração

Após determinação do LQ, duas curvas analíticas (com e sem EPN) foram obtidas no intuito de avaliar a linearidade e determinar o F_C do método. A curva com EPN do TBZ ([Figura 25](#)) foi obtida na faixa de 0,18 µmol/L (LQ) a 7,5 µmol/L (ou 36,2 µg/L a 1,5 mg/L), utilizando o procedimento de EPN sob as melhores condições. Já a curva sem EPN ([Figura 26](#)) foi feita utilizando a faixa de 2,0 µmol/L (LQ) a 112,5 µmol/L (ou 0,4 mg/L a 22,6 mg/L), sem EPN. O F_C , calculado a partir do quociente do coeficiente angular das curvas analíticas com extração (a_1) e sem extração (a_2), atingiu um valor de 12,8 (a_1 de 0,01608 uA/molL⁻¹ e a_2 de 0,00125 uA/molL⁻¹). Tal fator representa uma extração e uma pré-concentração da amostra de aproximadamente 13 vezes. A linearidade atingida no método de EPN, avaliada a partir do coeficiente de correlação da curva, foi de 0,99 e, portanto, dentro do limite estipulado (acima de 0,99) pela ANVISA (2003) e pela Comissão Europeia (2020).

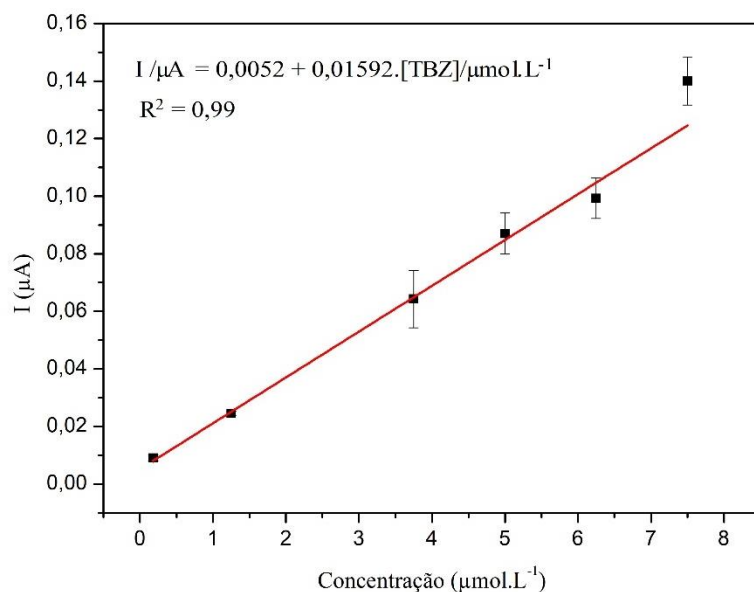


Figura 25: Curva analítica obtida sob melhor condição do procedimento de EPN. FM = TF (0,01 mol L⁻¹, pH 7,0):ACN na proporção 69:31 (V/V), volume de injeção de 20 μL e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

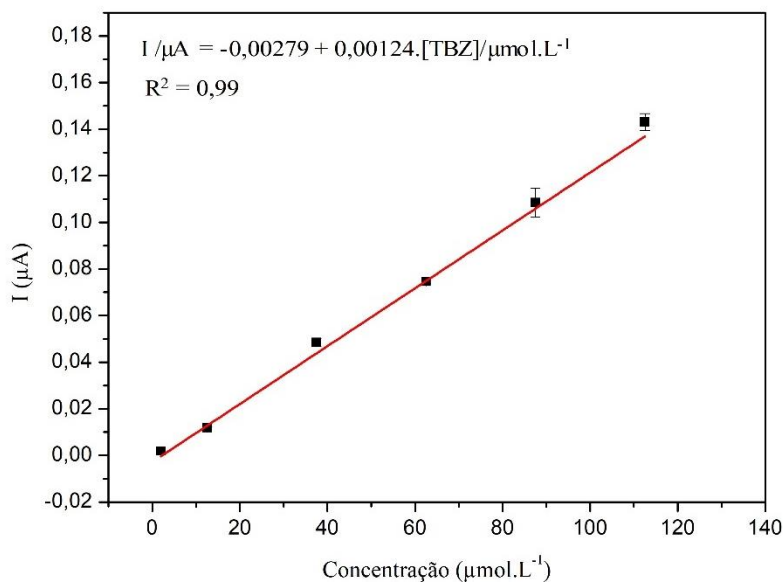


Figura 26: Curva analítica obtida sem procedimento de EPN. FM = TF (0,01 mol/L, pH 7,0):ACN na proporção 69:31 (V/V), volume de injeção de 20 μL e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

4.5.3 Exatidão e Precisão intradia e interdia

A confiabilidade do método também é verificada por meio de ensaios que determinam sua exatidão e precisão. Para a exatidão, foi medida a recuperação (R%, [Equação 2](#)) da adição de TBZ em suco de uva branco em três níveis (0,25 mg/L, 0,76 mg/L e 1,26 mg/L), em triplicata. A

precisão, por sua vez, foi expressa por meio do coeficiente de variação (CV%), pela média entre as replicatas (replicabilidade ou precisão intradia) e a média entre os dias (precisão intermediária ou precisão interdia). Os valores estão ilustrados na [Tabela 5](#), a seguir:

Tabela 5: Exatidão (%) e precisão (%) intradia e interdia, obtidas na determinação eletroquímica do TBZ após processo de EPN. FM = TF (0,01 mol/L, pH 7,0):ACN na proporção 69:31 (V/V), volume e injeção de 20 µL. $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

Amostra (µmol/L)*	Intradia						Interdia	
	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dias 1, 2 e 3	
	R%	CV%	R%	CV%	R%	CV%	R% Médio	CV% Médio
1,25	120	9,9	119,3	7,2	109,1	5,2	119,3	7,4
3,75	114,5	11,5	104,2	0,8	97,2	2	105,32	4,8
6,25	96,3	4,5	99,3	6,8	100,6	7	98,72	6,1

* 1,25 µmol/L = 0,25 mg/L; 3,75 µmol/L = 0,76 mg/L; 6,25µmol/L = 1,26 mg/L

A Comissão Europeia, assim como a ANVISA, estipula que um método confiável tem sua recuperação entre 70% e 120%, com $CV \leq 20\%$. Os resultados apresentados na [Tabela 5](#) indicam que o método é confiável, uma vez que se apresenta dentro da faixa de confiabilidade de recuperação e coeficiente de variação de 98,7% a 116,1% e 4,8% a 7,1%, respectivamente.

4.5.4 Aplicação do método EPN/CLAE-EC

Após verificação da confiabilidade do método (seletividade, linearidade, LD, LQ, exatidão e precisão), ele foi aplicado, em suas melhores condições, em outras marcas de suco de uva branco. Tais sucos foram adquiridos em comércios locais da cidade de Catalão(GO), distribuídos como sucos integrais (sem adição de açúcares ou água) e sem adição de outros aditivos. Esse processo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a capacidade do método em realizar tanto a extração e a pré-concentração quanto a quantificação do analito, em uma mesma matriz, mas de outras procedências. Para isso, foi preparado um ensaio no nível intermediário (0,76 mg/L), em triplicata, analisando a recuperação do método e o coeficiente de variação a partir da curva analítica apresentada na [Figura 26](#) (curva sem EPN). A seguir, estão expostos os resultados obtidos na aplicação do método para duas marcas de suco distintas da que foi adotada para obtenção das melhores condições, com adição do TBZ e do branco das respectivas matrizes.

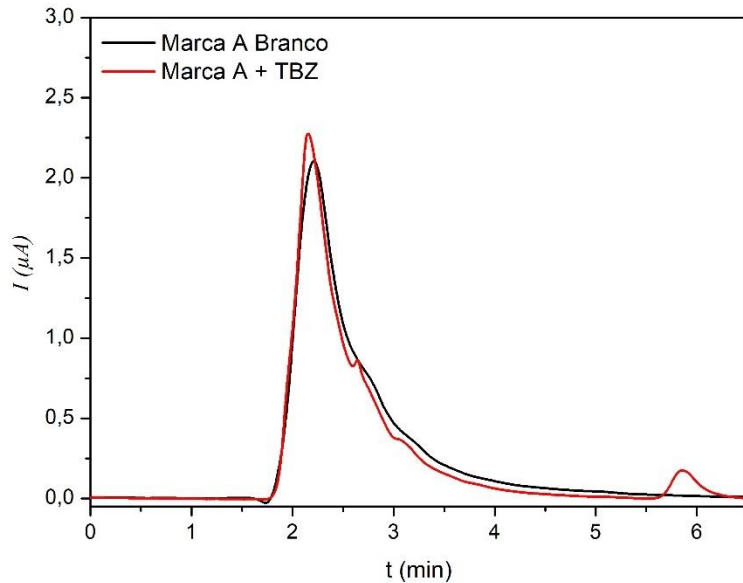


Figura 27: Cronoamperograma obtido por detecção eletroquímica do suco da Marca A, após processo de EPN na melhor condição, adicionando $3,75 \mu\text{mol/L}$ da solução padrão de TBZ $1,0 \mu\text{g/mL}$ e seu respectivo branco. FM = TF ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7):ACN na proporção de 69:31 (V/V), volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

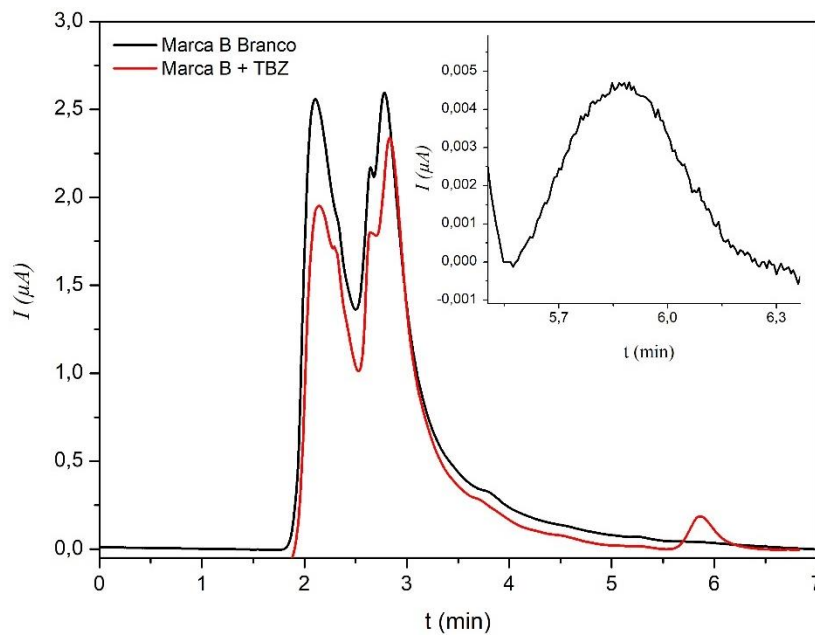


Figura 28: Cronoamperograma obtido por detecção eletroquímica do suco da Marca B, após processo de EPN na melhor condição, adicionando $3,75 \mu\text{mol/L}$ da solução padrão de TBZ $1,0 \mu\text{g/mL}$ e seu respectivo branco. FM = TF ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7):ACN na proporção de 69:31 (V/V), volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

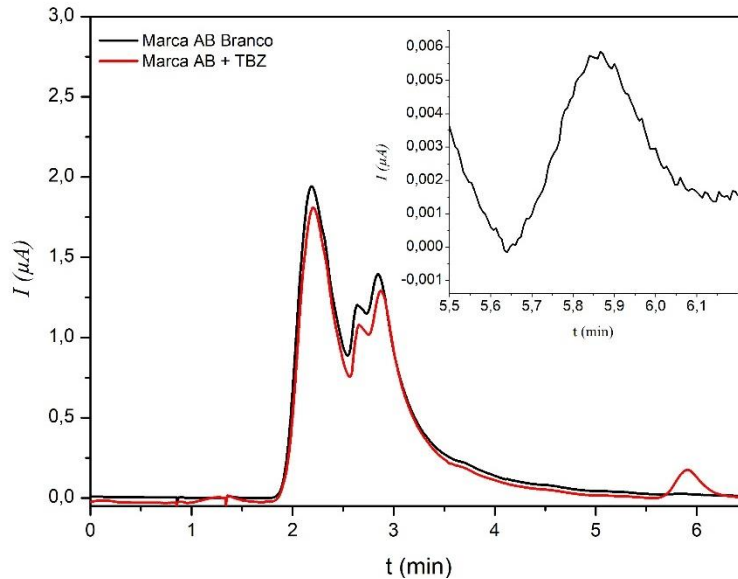


Figura 29: Cronoamperograma obtido por detecção eletroquímica do suco da junção dos sucos da Marca A e B, após processo de EPN na melhor condição, adicionando 3,75 $\mu\text{mol/L}$ da solução padrão de TBZ 1,0 $\mu\text{g/mL}$ e seu respectivo branco. FM = TF (0,01 mol L^{-1} , pH 7):ACN na proporção de 69:31 (V/V), volume de injeção de 20 μL e $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

As Figuras 27, 28 e 29, acima apresentadas, comprovam que o método conseguiu distinguir os sinais dos picos da matriz e do TBZ (seletividade) e, além disso, foi capaz de detectar a presença do TBZ no branco da amostra do suco B (Figura 28) e na mistura das marcas (Figura 29). As concentrações de TBZ nessas amostras foram de 84,4 $\mu\text{g/L}$ e 78,8 $\mu\text{g/L}$ para as marcas B e AB, respectivamente. Tais valores são superiores ao LQ estimado no método (36,2 $\mu\text{g/L}$) e, portanto, válidos. Conforme relatório apresentado pelo PARA (ANVISA, 2019), o TBZ não pode ser encontrado como resíduo em amostras de uva e derivados. Desse modo, os resultados identificaram contaminação em relação à amostra da marca B.

Levando-se em consideração o que foi exposto em relação à seletividade do método e aos estudos de recuperação e coeficiente de variação, os resultados obtidos em outras marcas de suco bem como da mistura entre elas podem também ser utilizados para determinar a robustez do método. Para isso, foi realizado um ensaio de recuperação e exatidão, na concentração de 0,76 mg/L (ponto médio), em triplicata, com as três amostras estipuladas anteriormente. Os resultados expostos (Tabela 6) enquadram-se dentro da faixa adequada (70%-120%, $\text{CV} \leq 20\%$) e, portanto, complementam os resultados relativos à validação do método de EPN/CLAE-EC.

Tabela 6: Recuperação (R%) e exatidão (CV%), obtidas na determinação eletroquímica do TBZ em outras amostras de suco de uva integral branco. FM = TF (0,01 mol L⁻¹, pH 7,0):ACN na proporção 69:31 (V/V), volume de injeção de 20 µL. $E = 1,40 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$.

Suco A		Suco B		Mistura de sucos		Suco Tinto	
R (%)	C (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
80,9	7,3	95,6	15,1	94,5	2,6	98,4	5
3,5 µmol/L (0,76 mg/L)							

Por efeito de comparação, a [Tabela7](#) (ver mais à frente) mostra os dados encontrados de outros estudos envolvendo a detecção do TBZ em diversas matrizes, diversos equipamentos e métodos de extração. De acordo com essa tabela, fica clara a grande variedade de métodos existentes.

Utilizando os LD como comparativos dos resultados obtidos, identifica-se uma faixa superior a quatro ordens de grandeza. O menor LD apresentado foi de 0,1 µg/L, utilizando a combinação de EFS (extração em fase sólida) com CLAE/Fluorescência, para matriz de água (leito de rio, residuais e de poço). O maior LD foi de 6,19 mg/L, combinando ELL/EFS com detecção por CG-EM, para suco de uva integral. Como visto durante o trabalho, a matriz de suco de uva integral é complexa, e muitos dos dados relativos à composição dessa matriz foram descritos por Alves (2014). Essa complexidade exige uma combinação bem alinhada entre extração e detecção. A utilização da EPN cumpre o papel de, além de promover a redução do consumo de substâncias prejudiciais ao meio ambiente (como os solventes orgânicos), atentar à segurança laboral e promover uma extração e uma pré-concentração adequadas do analito para matrizes complexas.

A detecção, quando avaliada na perspectiva de ressaltar o analito em detrimento aos demais sinais da amostra, tem também papel fundamental. O analito em questão apresenta grupos cromóforos e, em determinadas faixas de pH, tem maior atividade eletroquímica. As técnicas que exploraram essas características apresentaram os menores LD expressos na tabela.

Como discutido na seção anterior, o TBZ em amostras de uva e derivados não pode ser encontrado (ANVISA, 2019). Portanto, um estudo que apresente um LD e um LQ na ordem de grandeza de mg/L (14,5 µg/L e 36,2 µg/L, respectivamente) pode ser considerado muito bom. Esses valores ficam ainda melhores ao serem incorporados na [Tabela7](#), confrontando outros valores para a mesma matriz (suco de uva). O LQ, então, é 250 vezes menor do que o apresentado por Alves (2014), 9,0 mg/L. Os valores de R% e CV% (ou DPR%) contribuem para

comprovar a qualidade do método desenvolvido neste estudo, que combinou EPN e CLAE-EC com eletrodo de DDB.

Tabela 7: LD, LQ, R% e DPR% de estudos apresentados na literatura, referentes à determinação de TBZ em várias matrizes, utilizando diferentes métodos de extração e análise (ver na próxima página).

Matriz	Método de extração	Método Analítico	LD	LQ	R%	DPR%	Referência
Água (leito de rio, residuais purificados e de poço artificial)	EPN	CLAE/Fluorescência	0,12 µg/L	-	86 a 89	< 17	HALKO et al., 2004
	EFS		0,1 µg/L	-	92 a 95	< 9	
Frutas e vegetais	SUSME	LC/Fluorescência	0,4 µg/kg	1,3-1800 µg/kg	93 a 102	3,5	MORAI et al., 2009
Água e sob	DLLME	CLAE/Fluorescência	0,5 a 1,0 µg/L para água; 1,0 e 1,6 µg/kg para sob	2,0 e 3,2 µg/L	86,0 a 92,5	3,5 a 6,8	WU et al., 2009
Sucos de Laranja, maçã, banana e pera	-	Imunoensai	0,25 µg/L	-	81 a 123,6	9,9 a 19,3	BLAZKOVÁ et al., 2010
Maçã	-	SERS	10 µg/kg	-	89,2 a 115,4	-	HE, CHEN e LABUZA, 2014
Suco de uva integral	ELL/EFS	CG-EM	6,19 mg/L	9,00 mg/L	84	3,9	ALVES, 2014
Maçã	QUECHERS	SERS-Au	0,1 mg/kg	-	85 a 107	4,74	LUO et al., 2016
Maçã, tomates, alho-poró e água	-	VC e VPD (nanotubo de carbono)	10 µg/L	-	88,2 a 104	3,3	DONG et al., 2017
Suco de laranja	-	Fluorescência e UV-vis	0,1 mg/L	-	101,1 a 104,6	< 2,5	Q.CHEN et al., 2017
Casca de laranja e limão	MHFMM-MIP	CLAE/UV	4,0 e 9,0 µg/kg	-	106,1 e 105,1	< 4	DÍAZ-ALVAREZ et al., 2018
Suco de laranja	EFS	SERS	4,0 mg/L	13,0 mg/L	Impressa - 87 a 108,8; Não impressa - 46,5 a 53,8	Impressa < 2,4; Não impressa < 2,8	FENG et al., 2018
Água deionizada	-	Complexo de Cobre ligado à Irima (VC)	3,5 µg/L (UV-vis) e 0,265 µg/L (VC)	-	-	-	KAUR et al., 2018
Suco de limão, cenoura e manga	-	SERS(AuNRS)	0,149 a 0,216 mg/L	-	96 a 99	-	ALSAMMARRAIE et al., 2018
Maçã	-	SERS/GNR	60 µg/L	0,980 mg/L	76 a 106	15,4	FU et al., 2019
Laranja	SBSE	CLAE/UV	0,10 mg/kg	0,30 mg/kg	21	6	DÍAZ-ALVAREZ et al., 2019
Tomate	EPN	CLAE/EC	5,5 µg/L	11 µg/L	81 a 115	< 15	CAIXETA, 2019
Chá Oolong	-	SERS (AuNP/ESM)	0,1 mg/L	-	-	-	Q.DING et al., 2019
Suco de pessego	-	SERS (Ag-Au-IP6-MI-101(Fe))	50 µg/L	-	84,4 a 112,8	2,7 a 17,2	T.Xuan et al., 2019
Cara de açúcar, manga, água natural bruta e formulação farmacêutica	-	VC e VOQ (DDB)	14,5 µg/L	85,0 µg/L	71,0 a 103,3	0,9 a 5,3	Ribeiro et al., 2019
Água de torreira, Suco de pera e Espinafre de água	-	VOQ (MW/CNTs-COOH/MoS2)	12 µg/L	-	92,8 a 101,9	< 5	CHENG et al., 2020
Arroz	ELL	SERS (HAu/Ag NS)	0,604 mg/L	0,792 mg/L	91,74 a 97,86	< 6	HASSAN et al., 2022
Maçã, Pera, Laranja	ELL	Fluorescência e UV-vis (com ativador fotoluminescente de Ir)	6,03 µg/L	-	89,6 a 109,3	0,14 a 2,95	Y.Ding et al., 2019
Suco de uva branco integral	EPN	CLAE/EC	25,5 µg/L	36,2 µg/L	98,7 a 116,1	4,8 a 7,2	Este trabalho

SUSME - solvente supramolecular constituído por micelas

EPN - extração por ponto nuvem

EFS - Extração por fase sólida

DLLME - micro extração líquido-líquido dispersiva

ELL - extração Líquido Líquido

QUECHERS - *quick, easy, cheap, efficient, rugged, and safe* (Extração por fase sólida, dispersiva após partição com solvente orgânico e solução salina)

SBSE - Extração Sólida em barra de Agitação

MW/CNTs-COOH/MoS2 - Composto de Dissulfeto de Molibdeno dopado com Nano tubos de carbono de parede múltipla

VOQ - Voltametria de Onda Quadrada

AuNP/ESM - Membrana de casca de ovo revestida de nano partículas de ouro

HAu/Ag NS - Nano estrelas de prata dopado com Ouro (*Yellow Au/Ag nanostar*)

5 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados consolidam a capacidade de acoplamento entre as técnicas de CLAE e a detecção eletroquímica de TBZ extraído por EPN de amostras de suco de uva integral branco.

Os métodos de VC e VPD permitiram avaliar o comportamento do TBZ na superfície do eletrodo DDB e o pH do eletrólito suporte utilizado como eluente (TF pH 7,0). O processo de obtenção das melhores condições, eletroquímicas (1,4 V × Ag/AgCl, 3,0 mol/L) e cromatográficas (Fase Móvel = TF pH 7,0:ACN em 69:31 (V/V), 1,2 mL/min, Coluna C8), resultou na separação do analito dos interferentes da matriz, com o maior sinal de corrente, tornando o método mais seletivo.

As melhores condições de EPN (27°C, adição de 10% de Tergitol TMN6, agitação ultrassônica por 60 min e pH 6,0) possibilitaram a extração e a pré-concentração do analito em aproximadamente 13 vezes ($F_C = 12,8$), a partir do cálculo entre o coeficiente angular das curvas analíticas com e sem EPN. O método apresentou ótima linearidade ($R^2 = 0,99$).

Os valores de recuperação e de coeficiente de variação obtidos estiveram dentro do estipulado pela ANVISA e pela Comissão Europeia ($R\%$ intradia = 95% e 120 % e $R\%$ interdia = 98,7% e 116,1%, $CV\%$ intradia = 0,8% e 11% e $CV\%$ interdia = 4,8% e 7,4%). O método foi aplicado em outras marcas de suco encontradas em mercados comerciais, nas quais em uma delas foi possível detectar e quantificar a presença de TBZ. Ao comparar com o único estudo encontrado na literatura que faz determinação de TBZ em amostras de suco de uva integral, o trabalho que combina CLAE, com detecção por EC e Extração por Ponto Nuvem, atingiu um LD e um LQ 240 vezes menor.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR JR, O.; GOLLÜCKE, A. P. B.; MORAES, B. B. de; PASQUINI, G.; CATHARINO, R. R.; RICCIO, M. F.; IHARA, S. S. M.; RIBEIRO, D. A. Grape juice concentrate prevents oxidative DNA damage in peripheral blood cells of rats subjected to a high-cholesterol diet. *British Journal of Nutrition*, 105 (5), p. 694-702, 2011.

ALSAMMARRAIE, F. K.; LIN, M.; MUSTAPHA, A.; LIN, H.; CHEN, X.; CHEN, Y.; WANG, H.; HUANG, M. Rapid determination of thiabendazole in juice by SERS coupled with novel gold nanosubstrates. *Food Chemistry*, v. 259, p. 219-225, 2018.

ALVES, A. A. R. *Determinação da composição volátil, não-volátil e análise de resíduos de agrotóxicos em sucos de uva integrais brasileiros*. 2014. 128 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

ANDRADE, L. S.; DE MORAES, M. C.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O.; CASS, Q. B. A multidimensional high performance liquid chromatography method coupled with amperometric detection using a boron-doped diamond electrode for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk. *Analytica Chimica Acta*, v. 654 (2), p. 127-132, 2009.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RE nº 899, de 29 de maio de 2003. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 29 maio 2003.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 295, de 29 de julho de 2019. Dispõe sobre os critérios para avaliação do risco dietético decorrente da exposição humana a resíduos de agrotóxicos, no âmbito da Anvisa, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 31 jul. 2019.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos - PARA: Relatório das Amostras Analisadas no período de 2017-2018 e Primeiro ciclo do Plano Plurianual 2017-2020*. Brasília, DF, 10 dez. 2019.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografias Autorizadas – Tiabendazol, 25 nov. 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas-por-letra>>. Acesso em: 29 set. 2021.

BENBRAHIM, M.; AMMAR, H. B.; ABDELHE, R.; SAMET, Y. Electrochemical behavior and analytical detection of Imidacloprid 4 insecticide on a BDD electrode using square-wave voltammetric method. *Chinese Chemical Letters*, v. 27, issue 5, p. 666-672, 2016.

BLAZKOVÁ, M.; RAUCH, P.; FUKAL, L. Strip-based immunoassay for rapid detection of thiabendazole. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 25, p. 2122-2128, 2010.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e a rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 11 jul. 1989.

CAIXETA-NETA, A. *Determinação eletroquímica do agrotóxico tiabendazol extraído e pré-concentrado em amostras de tomate pela técnica de ponto nuvem usando eletrodo de diamante dopado com boro*. 2019. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão, Catalão, 2019.

CAIXETA-NETA, A.; RIBEIRO, G. C.; DE AMORIM, K. P.; ANDRADE, L. S. Electrochemical determination of thiabendazole pesticide extracted and preconcentrated from tomato samples by cloud point extraction. *Analytical Methods*, v. 12, issue 48, p. 5823-5832, 2020.

CAMARGO, U. A.; TONIETTO, J.; HOFFMANN, A. Progressos na viticultura brasileira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33, n. SPE1, p. 144-149, 2011.

CHEN, M.; HU, X.; TAI, Z.; QIN, H.; TANG, H.; LIU, M.; YANG, Y. Determination of Four Synthetic Phenolic Antioxidants in Edible Oils by High-Performance Liquid Chromatography with Cloud Point Extraction Using Tergitol TMN-6. *Food Analytical Methods*, v. 6, p. 28-35, 2012.

CHEN, Q.; ZUO, J.; HE, X.; MO, X.; TONG, P.; ZHANG, L. Enhanced fluorescence of terbium with thiabendazole and application in determining trace amounts of terbium and thiabendazole. *Talanta*, v. 162, p. 540-546, 2017.

CHENG, F.; LIAO, X.; HUANG, Z.; XU, L.; ZHOU, X.; ZHANG, X. Highly sensitive detection of thiabendazole residues in food samples based on multiwall carbon nanotubes decorated two-dimensional layered molybdenum disulfide. *Food Analytical Methods*, v. 13, p. 811-822, 2020.

CHEYNIER, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 81, p. 223-229, 2005.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Análise Mensal, ago. 2017. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-uva>>. Acesso em: 11 abr. 2020.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Análise Mensal, ago./set. 2019. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-uva>>. Acesso em: 11 abr. 2020.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Análise Mensal, dez. 2019/jan. 2020. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e>>

[extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-uva](#)>. Acesso em: 11 abr. 2020.

DANI, C.; OLIBONI, L. S.; PASQUALI, M. A. B.; OLIVEIRA, M. R.; UMEZO, F. M.; SALVADOR, M.; MOREIRA, J. C. F.; HENRIQUES, J. A. P. Intake of purple grape juice as a hepatoprotective agent in Wistar rats. *Journal of medicinal food*, v. 11, n. 1, p. 127-132, 2008.

DANI, C.; OLIBONI, L. S.; VANDERLINDE, R.; PRA, D.; DIAS, J. F.; YONEAMA, M. L.; BONATTO, D.; SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. Antioxidant activity and phenolic and mineral content of rose grape juice. *Journal of medicinal food*, v. 12, n. 1, p. 188-192, 2009.

DE AMORIM, K. P. *Desenvolvimento de um método por ponto nuvem dos hormônios naturais E1 e E2 em amostras de urina e determinação por CLAE/EC utilizando eletrodo de diamante dopado com boro*. 2015. 56 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão, Catalão, 2015.

DE MOURA, C. F.; RIBEIRO, F. A.; DE JESUS, G. P.; DA SILVA, V. H.; OSHIMA, C. T.; GOLLÜCKE, A. P.; AGUIAR JR, O.; RIBEIRO, D. A. Antimutagenic and antigenotoxic potential of grape juice concentrate in blood and liver of rats exposed to cadmium. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, p. 13118-13126, 2014.

DÍAZ-ALVAREZ, M.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Hollow fiber membrane-protected molecularly imprinted microspheres for micro solid-phase extraction and clean-up of thiabendazole in citrus samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1531, p. 39-45, 2018.

DÍAZ-ALVAREZ, M.; TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymer monolith containing magnetic nanoparticles for the stir-bar sorptive extraction of thiabendazole and carbendazim from orange samples. *Analytica Chimica Acta*, v. 1045, p.117-122, 2019.

DING, Q.; HE, X.; WANG, M.; LIN, M.; YANG, D-P. Eggshell membrane-templated gold nanoparticles as a flexible SERS substrate for detection of thiabendazole. *Microchimica Acta*, v. 186, n. 453, 2019.

DING, Y.; DONG, J.; LI, L.; ZHOU, Y. Iridium solvent complex as a new sensitive probe to detect benzimidazole esticides based on photoluminescent signals “switch-on” via coordination mechanism. *Food Chemistry*, v. 390, 133186, 2022.

DONG, Y.; YANG, L.; ZHANG, L. Simultaneous electrochemical detection of benzimidazole fungicides carbendazim and thiabendazole using a novel nano-hybrid material modified electrode. *J. Agric. Food Chem.*, v. 65, n. 4, p. 727-736, 2017.

DORNELLAS, R. M.; FRANCHINI, R. A. A.; DA SILVA, A. R.; MATOS, R. C.; AUCÉLIO, R. Q. Determination of the fungicide kresoxim-methyl in grape juices using square-wave voltammetry and a boron-doped diamond electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 708, p. 46-53, 2013.

DORNELLAS, R. M.; NOGUEIRA, D. B.; AUCELLO, R. Q. The boron-doped diamond electrode voltammetric method for ultra-trace determination of the fungicide pyraclostrobin and evaluation of its photodegradation and thermal degradation. *Analytical Methods*, v. 6, p. 944-950, 2014.

DRAGOE, D.; SPĂȚARU, N.; KAWASAKI, R.; MANIVANNAN, A.; SPĂȚARU, T.; TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A. Detection of trace levels of Pb²⁺ in tap water at boron-doped diamond electrodes with anodic stripping voltammetry. *Electrochimica Acta*, v. 51, p. 2437-2441, 2006.

DUARTE, E. H.; CASARIN, J.; SARTORI, E. R.; TARLEY, C. R. T. Highly Improved Simultaneous Herbicides Determination in Water Samples by Differential Pulse Voltammetry using Boron-Doped Diamond Electrode and Solid Phase Extraction on Cross-Linked Poly(vinylimidazole). *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 255, parte 1, p. 166-175, 2018.

EFSA (European Food Safety Authority), 2016. Reasoned opinion on the Revision of the review of the existing maximum residue levels for thiabendazole. *EFSA Journal*, 14 (6), 4516, 2016. Disponível em: <<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2016.4516>>. Acesso em: 29 set. 2021.

EKMAN, E.; FANIBAND, M. H.; LITTORIN, M.; MAXE, M.; JÖNSSON, B. A. G.; LINDH, C. H. Determination of 5-hydroxythiabendazole in human urine as a biomarker of exposure to thiabendazole using LC/MS/MS. *Journal of Chromatography B*, v. 973, p. 61-67, 2014.

EUROPEAN Commission (Comissão Europeia). Document n° SANTE/2017/11813, de 01 de janeiro de 2020. Disponível em: <https://commission.europa.eu/index_en>. Acesso em: 29 set. 2021.

FENG, J.; HU, Y.; GRANT, E.; LU, X. Determination of thiabendazole in orange juice using an MISPE-SERS chemosensor. *Food Chemistry*, v. 239, p. 816-822, 2017.

FERREIRA, S. A. D. *Fotodegradação do fungicida tiabendazol usando rejeitos industriais com propriedades magnéticas*. 2018. 131 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES, 2018.

FLORES, V. A.; RIBEIRO, J. N.; NEVES, A. A.; DE QUEIROZ, E. L. R. Organoclorados: um problema de saúde pública. *Ambiente & Sociedade*, v. 7, n. 2, p. 111-125, 2004.

FU, G.; SUN, D.; PU, H.; WEI, Q. Fabrication of gold nanorods for SERS detection of thiabendazole in apple. *Talanta*, v. 195, p. 841-849, 2019.

FUJII, T.; MIKURIYA, H.; SASAKI, M. Chronic oral toxicity and carcinogenicity study of thiabendazole in rats. *Food Chem Toxicol*, v. 29, n. 11, p. 771-775, 1991.

FUJITANI, T.; TADA, Y.; YONEYAMA, M. Effects of thiabendazole (TBZ) on mitochondrial function in renal cortex of ICR mice. *Food Chem. Toxicology*, v. 27, p. 307-315, 1999.

GOLLÜCKE, A. P. B.; SOUZA, J. C.; TAVARES, D. Q. Sensory stability of concord and isabel concentrated grape juices during storage. *Journal of Sensory Studies*, v. 23, p. 340-353, 2008.

GUERRA, C. C.; BITARELO, H.; BEN, R. L.; MARIN, A. *Sistema para elaboração de suco de uva integral em pequenos volumes: suquificador integral*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2016. (Documentos, 96).

HASSAN, M. M.; XU, Y.; ZAREEF, M.; LI, H.; CHEN, Q. Simultaneous determination of benzimidazole fungicides in food using signal optimized label-free HAu/Ag NS-SERS sensor. *Food Chemistry*, v. 397, 133755, p. 1-8, 2022.

HE, L.; CHEN, T.; LABUZA, T. P. Recovery and quantitative detection of thiabendazole on apples using a surface swab capture method followed by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, v. 148, p. 42-46, 2014.

IBRAVIN, Instituto Brasileiro de Vinhos. Comparativo de comercialização, empresas do RS em litros (venda externa*), jan. a dez. 2015. Bento Gonçalves, RS, 2015.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Documento nº DOQ-CGCRE-008, revisão de jun. 2020.

JALIL, M. E. R.; BASCHINI, M.; RODRÍGUEZ-CASTELLÓN, E.; INFANTES-MOLINA, A., SAPAG, K. Effect of the Al/clay ratio on the thiabendazol removal by aluminum pillared clays. *Applied Clay Science*, v. 87, p. 245-253, 2014.

JEVTIĆ, S.; STANKOVIĆ, D.; JOKIĆ, A.; PETKOVIĆ, B. A mini-review of electroanalytical methods for pesticides quantification. *Publication in Natural Sciences*, University Thought, v. 9, n. 2, p. 19-32, 2019.

JEVTIĆ, S.; STEFANOVIĆ, A.; STANKOVIĆ, D. M.; PERGAL, M. V.; IVANOVIĆ, A. T.; JOKIĆ, A.; PETKOVIĆ, B. Boron-doped diamond electrode – A prestigious unmodified carbon electrode for simple and fast determination of bentazone in river water samples. *Diamond and Related Materials*, v. 81, p. 133-137, 2018.

KAUR, M.; RAJ, P.; SINGH, N.; KUWAR, A. S.; KAUR, N. Benzimidazole-Based Imine-Linked Copper Complexes in Food Safety: Selective Detection of Cyproheptadine and Thiabendazole. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, v. 6 (3), p. 3723-3732, 2018.

KHAMMAS, Z. A. A.; AHMAD, S. S. Cloud Point Extraction of Carbendazim Pesticide in Foods and Environmental Matrices Prior to Visible Spectrophotometric Determination. *Science Journal of Analytical Chemistry*, v. 6, issue 3, p. 30-41, 2016.

KISSINGER, P. T.; REFSHAUGE, C.; DREILING, R.; ADAMS, R. N. An Electrochemical Detector for Liquid Chromatography with Picogram Sensitivity. *Analytical Letters*, v. 6, p. 465-477, 1973.

KORI, S. Cloud point extraction coupled with back extraction: a green methodology in analytical chemistry. *Forensic Sciences Research*, p. 19-33, 2019.

LAMAS, C. de A. CUQUETTO-LEITE, L.; SILVA, E. N da; THOMAZINI, B. F.; CORDEIRO, G. S.; PREDES, F. S.; GOLLÜCKE, A. P. B.; DOLDER, H. Grape juice concentrate alleviates epididymis and sperm damage in cadmium-intoxicated rats. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 98, issue 2, p. 86-99, 2017.

LEÃO, P. C. de S. Avanços e perspectivas da produção de uvas de mesa no Vale do Submédio São Francisco. *Todafruta - Boletim Frutícola*, n. 15, p. 1-7, 2021.

LEÃO, P. C. de S (Ed.). *Cultivo da Videira*. [S.l.]: Embrapa, 2004. (Embrapa Semi-Árido. Sistemas de Produção, 1). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/156149/cultivo-da-videira>>. Acesso em: 11 abr. 2020.

LIU, T.; CAO, P.; GENG, J.; LI, J.; WANG, M.; LI, X.; YIN, D. Determination of triazine herbicides in milk by cloud point extraction and 2 high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, v. 142, p. 358-364, 2014.

LIU, X.; FENG, W.; BAO, C.; JIA, Q. Determination of Carbamate Pesticides and Phthalates in Vegetables by a Cloud Point Extraction Process Using Tergitol 15-s-7 and High Performance Liquid Chromatography. *Analytical Letters*, v. 45, issue 18, p. 2663-2674, 2012.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. *Saúde em Debate*, v. 42, p. 518-534, 2018.

MAKRIS, D. P.; KALLITHRAKAB, S.; KEFALAS, P. Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, p. 396-404, 2006.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 4, p. 659-664, 2005.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Registro Agrotóxico. 2021. Disponível em: <<https://indicadores.agricultura.gov.br/agrofit/index.htm>>. Acesso em: 28 set. 2021.

MINTEZOL, MERK & CO. INC., 2003. CHEWABLE TABLETS AND SUSPENSION MINTEZOL® (Thiabendazole), 1983, p. 3-6.

MOHD, N. I.; ZAIN, N. N. M.; RAOOV, M.; MOHAMAD, S. Determination of carcinogenic herbicides in milk samples using green non-ionic silicone surfactant of cloud point extraction and spectrophotometry. *Royal Society Open Science*, v. 5, 171500, p. 1-13, 2018.

MORAES, R. F. de. *Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da*

captura regulatória. Texto para Discussão, 2506. Brasília / Rio de Janeiro: IPEA, 2019.

MORAL, A.; SICILIA, M. D.; RUBIO, S. Determination of benzimidazolic fungicides in fruits and vegetables by supramolecular solvent-based microextraction/liquid chromatography/fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, v. 650, p. 207-213, 2009.

MORTADA, W. Recent developments and applications of cloud point extraction: A critical review. *Microchemical Journal*, v. 157, 105055, 2020.

MUZYKA, K.; SUN, J.; FERREJA, T. H.; LAN, Y.; ZHANG, W.; XU, G. Boron-doped diamond: current progress and challenges in view of electroanalytical applications. *Analytical methods*, v. 11, n. 4, p. 397-414, 2019.

OIV, International Organisation of Vine and Wine. Country Profile: statistiques. 2016. Disponível em: <<https://www.oiv.int/en/statistiques/>>. Acesso em: 20 set. 2021.

OIV, International Organisation of Vine and Wine. State of the world vitivinicultural sector in 2020. Abril 2021. Disponível em: <<https://www.oiv.int/public/medias/7909/oiv-state-of-the-world-vitivinicultural-sector-in-2020.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2021.

PIGNATI, W.; LIMA, F. A. N. S.; LARA, S.S.; CORRÊA, M. L. M; BARBOSA, J. R.; LEÃO, L. H. C.; PIGNATTI, M. G. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 22, n. 10, p. 3281-3293, 2017.

RIBEIRO, F. W. P. *Sensores e biossensores eletroquímicos: ferramentas versáteis para a determinação de contaminantes ambientais*. 2014. 209 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

RIBEIRO, F. W. P.; DE OLIVEIRA, R. C.; DE OLIVEIRA, A. G.; NASCIMENTO, R. F.; BECKER, H.; LIMA-NETO, P. de; CORREIA, A. N. Electrochemical sensing of thiabendazole in complex samples using borondoped diamond electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 866, 114179, p. 1-8, 2020.

RIBEIRO, F. W. P.; SOUSA, C. P.; MORAIS, S.; LIMA-NETO, P. de; CORREIA, A. N. Sensing of formetanate pesticide in fruits with a boron-doped diamond electrode. *Microchemical Journal*, v. 142, p. 24-29, 2018.

RITSCHER, P. S.; MAIA, J. D. G.; CAMARGO, U. A. *Cultivares: uva para processamento: suco*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2011. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 72).

RIZZON, L. A.; LINK, M. Composição do suco de uva caseiro de diferentes cultivares. *Ciência Rural*, v. 36, n. 2, p. 689-692, 2006.

RIZZON, L. A.; MANFROI, V.; MENEGUZZO, J. *Elaboração de suco de uva na propriedade vitícola*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 1998. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 21).

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. *Suco de uva*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. (Coleção Agroindústria Familiar).

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Analytical characteristics and discrimination of Brazilian commercial grape juice, nectar, and Beverage. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 32, n. 1, p. 93-97, 2012.

ROCHA, S. A. N. *Extração em ponto nuvem com derivatização do surfactante: uma alternativa para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em águas naturais por cromatografia gasosa*. 2013. 100 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

SANTALADCHAIYAKIT, Y.; SRIJARANAI, S. A simplified ultrasound-assisted cloud-point extraction method coupled with high performance liquid chromatography for residue analysis of benzimidazole anthelmintics in water and milk samples. *Anal. Methods*, v. 4, p. 3864-3873, 2012.

SCHMIDT, S. K.; WONKA, A. European Commission. In: JONES, E.; MENON, A.; WEATHERILL, S. (Eds.). *The Oxford Handbook of the European Union*. [S.l.]: Oxford University Press, 2013. p. 336-349. Disponível em: <<http://oxfordhandbooks.com/view/10.1093/oxfordhb/9780199546282.001.0001/oxfordhb-9780199546282-e-24>>. Acesso em: 30 set. 2021.

SEEBUNRUENG, K.; SANTALADCHAIYAKIT, Y.; SRIJARANAI, S. Study on the effect of chain-length compatibility of mixed anionic-cationic surfactants on the cloud-point extraction of selected organophosphorus pesticides. *Anal Bioanal Chem*, v. 404, p. 1539-1548, 2012.

SÉÏDE, M.; MARION, M.; MATEESCU, M. A.; AVERILL-BATES, D. A. The fungicide thiabendazole causes apoptosis in rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, v. 32, p. 232-239, 2016.

SIDRA, Sistema IBGE de Recuperação Automática. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA). Março 2020. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/lspa/tabelas>>. Acesso em: 11 abr. 2020.

SIDRA, Sistema IBGE de Recuperação Automática. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA). Agosto 2021. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/lspa/tabelas>>. Acesso em: 27 set. 2021.

SIGMA-ALDRICH. Tergitol TMN 6. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/86453>>. Acesso em: 30 set. 2021.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. *Fundamentos de química analítica*. Tradução da edição norte-americana. 8. ed. [S.l.]: Editora Thomson, 2006. p. 627-666.

SONG, J.; ZHEN, W.; LI, Z.; LIAN, Y.; YANG, Y. Ultrasonic-assisted cloud point extraction for determination of nickel in water samples by flame atomic absorption spectrometry. *Water Sci Technol*, v. 66, issue 4, p. 792-798, 2012.

STANKOVIC, D. M.; KALCHER, K. Amperometric quantification of the pesticide ziram at boron doped diamond electrodes using flow injection analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 233, p. 144-147, 2016.

TADA, Y.; FUJITANI, T.; YONEYAMA, M. Acute renal toxicity of thiabendazole (TBZ) in ICR mice. *Food Chem. Toxicology*, v. 30, p. 1021-1030, 1992.

TADA, Y.; FUJITANI, T.; YANO, N.; YUZAWA, K.; NAGASAWA, A.; YONEYAMA, M. Thiabendazole induces urinary tract toxicity in male ICR mice. *Toxicology*, v. 162, p. 1-10, 2001b. doi:10.1016/s0300-483x(00)00460-1.

TADA, Y.; FUJITANI, T.; YANO, N.; YUZAWA, K.; NAGASAWA, A.; AOKI, N.; OGATA, A.; YONEYAMA, M. Chronic toxicity of thiabendazole (TBZ) in CD-1 mice. *Toxicology*, v. 169, p. 163-176, 2001a. doi: 10.1016/s0300-483x(01)00506-6.

THELINGWANI, R. S.; ZVADA, S. P.; DOLGOS, H.; UNGELL, A.-L. B.; MASIMIREMBWA, C. M. In vitro and in silico identification and characterization of thiabendazole as a mechanism-based inhibitor of CYP1A2 and simulation of possible pharmacokinetic drug-drug interactions. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 37, n. 6, p. 1286-1294, 2009.

TROIAN, S. A.; VICENZI, K.; ALVES, M. K. Teor de resveratrol e polifenóis totais em suco de uva integral, reconstituído e néctar comercializados no sul do Brasil. *Brazilian Journal of Food Research*, v. 7, n. 1, p. 58-67, 2016.

WATANABE, H.; TANAKA, H. A non-ionic surfactant as a new solvent for liquid-liquid extraction of zinc(ii) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol. *Talanta*, v. 25, p. 585-589, 1978.

WU, Q.; LI, Y.; WANG, C.; LIU, Z.; ZANG, X.; ZHOU, X.; WANG, Z. Dispersive liquid liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography fluorescence detection for the determination of carbendazim and thiabendazole in environmental samples. *Analytica Chimica Acta*, v. 638, p. 139-145, 2009.

XUAN, T.; GAO, Y.; CAI, Y.; WEN, Y.; YANG, H. Fabrication and characterization of the stable Ag-Au-metal-organicframeworks: An application for sensitive detection of thiabendazole. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 293, p. 289-295, 2019.

YAMINI, Y., FEIZI, N., MORADI, M. Chapter 7 - Surfactant-Based Extraction Systems. In: POOLE, Colin F. (Ed.). *Liquid-Phase Extraction: A volume in Handbooks in Separation Science*, 2020. p. 209-239.

ZHANG, W.; DUAN, C.; WANG, M. Analysis of seven sulphonamides in milk by cloud point extraction and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, v. 126, issue 2, p. 779-785, 2011.

ZOU, D.; QING, Y.; LI, Y.; LIU, M.; YANG, Y. Determination of manganese (VII), chromium (VI) and nickel (II) in medicinal herb samples by cloud-point extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of the Iranian Chemical Society*, v. 11, p. 415-422, 2014.

ANEXO

VOLTAMETRIAS CÍCLICAS E DE PULSO DIFERENCIAL DOS DIFERENTES PHS ANALISADOS

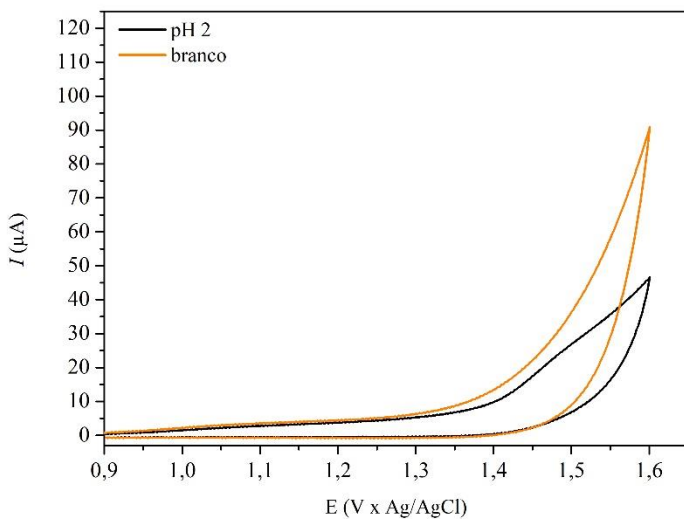


Figura A1: Voltamograma cíclico do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em diferentes pH 2,0, realizado na faixa de potencial de 0,9 V a 1,6 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L), $\nu = 100$ mV/s, eletrólito suporte TF (0,01 mol/L).

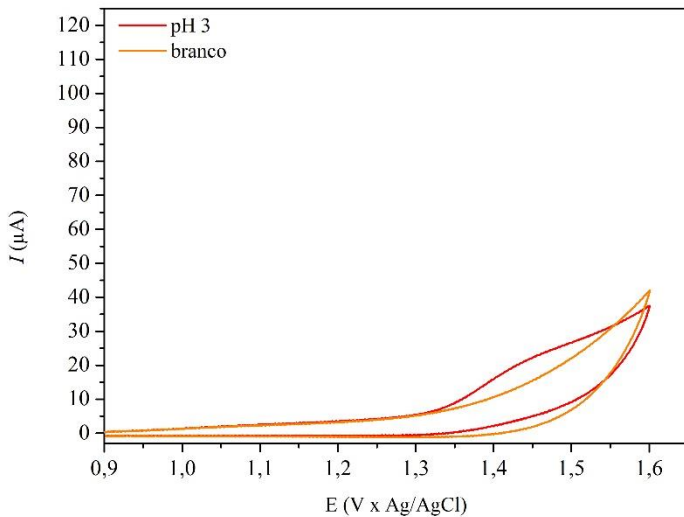


Figura A2: Voltamograma cíclico do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 3,0, realizado na faixa de potencial de 0,9 V a 1,6 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L), $\nu = 100$ mV/s, eletrólito suporte TF (0,01 mol/L).

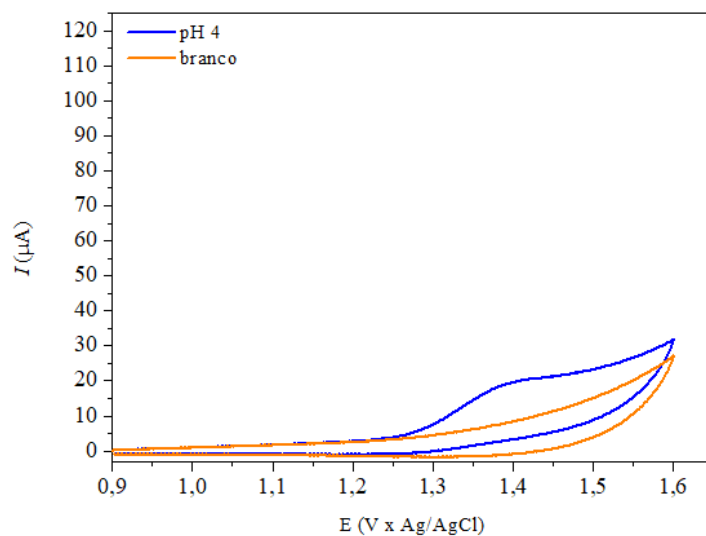


Figura A3: Voltamograma cíclico do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 4,0, realizado na faixa de potencial de 0,9 V a 1,6 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L), $\nu = 100$ mV/s, eletrólito suporte TF (0,01 mol/L).

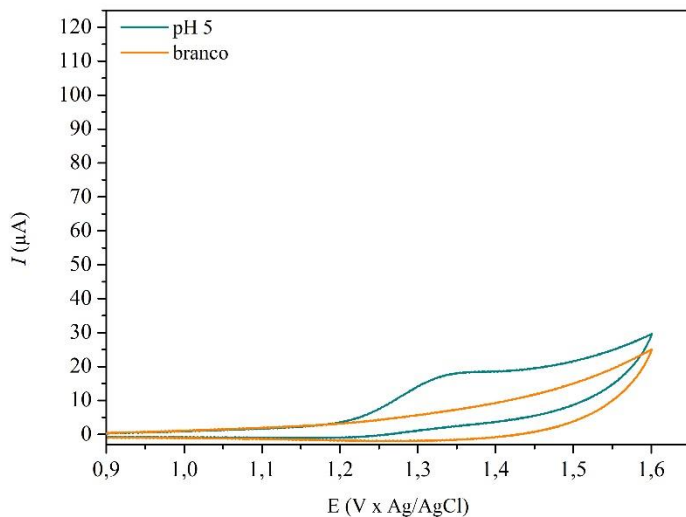


Figura A4: Voltamograma cíclico do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 5,0, realizado na faixa de potencial de 0,9 V a 1,6 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L), $\nu = 100$ mV/s, eletrólito suporte TF (0,01 mol/L).

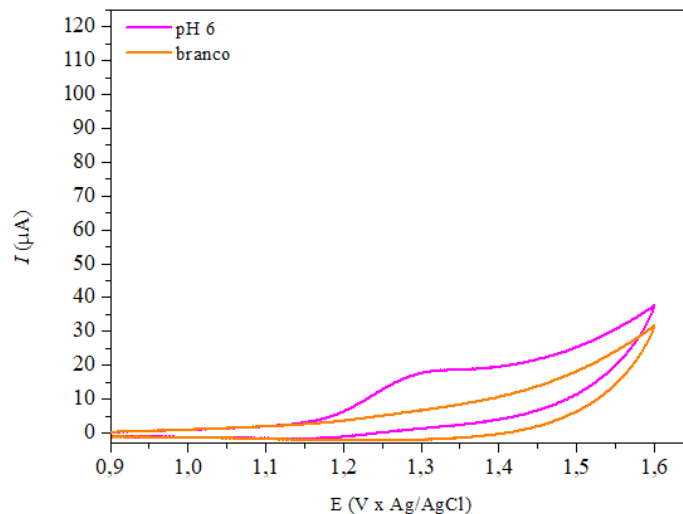


Figura A5: Voltamograma cíclico do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 6,0, realizado na faixa de potencial de 0,9 V a 1,6 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L), $\nu = 100$ mV/s, eletrólito suporte TF (0,01 mol/L).

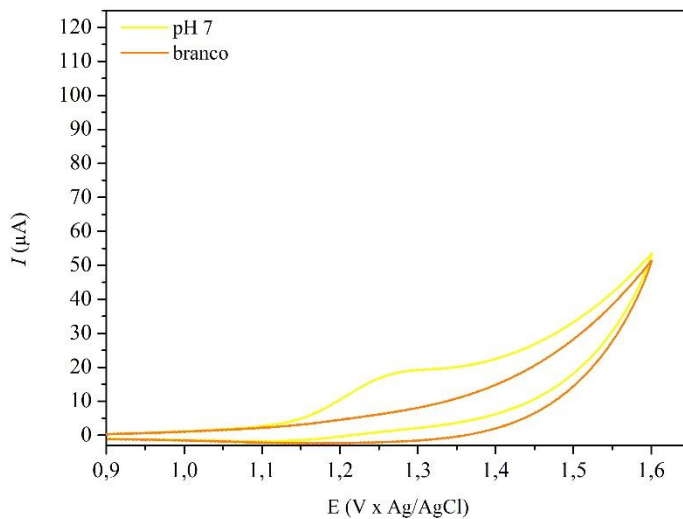


Figura A6: Voltamograma cíclico do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 7,0, realizado na faixa de potencial de 0,9 V a 1,6 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L), $\nu = 100$ mV/s, eletrólito suporte TF (0,01 mol/L).

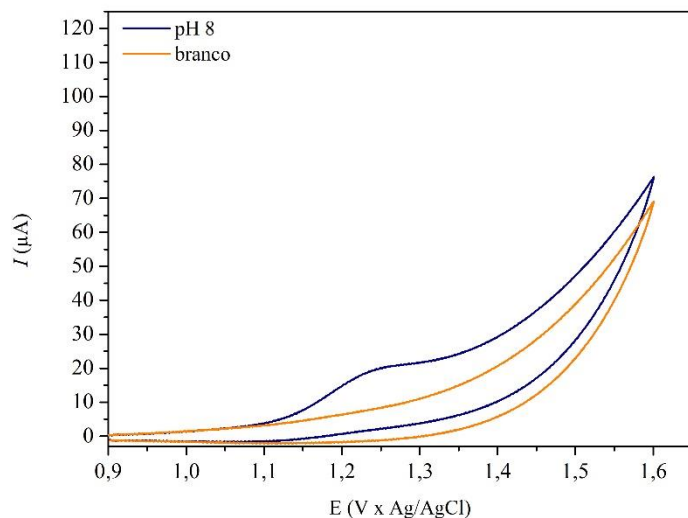


Figura A7: Voltamograma cíclico do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 8,0, realizado na faixa de potencial de 0,9 V a 1,6 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L), $\nu = 100$ mV/s, eletrólito suporte TF (0,01 mol/L).

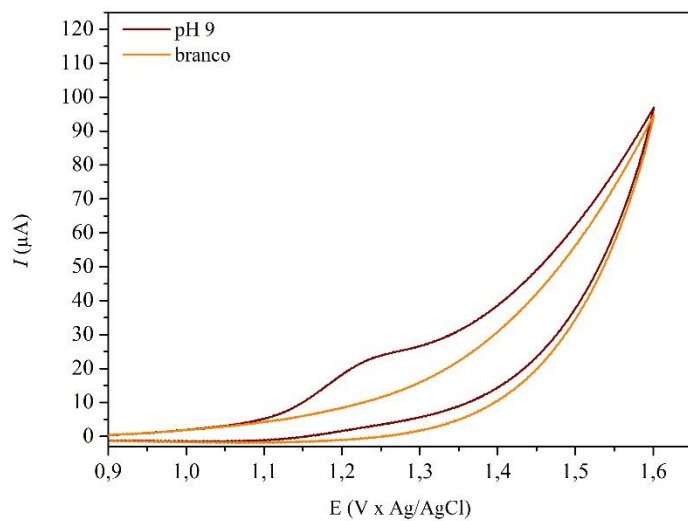


Figura A8: Voltamograma cíclico do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 9,0, realizado na faixa de potencial de 0,9 V a 1,6 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L), $\nu = 100$ mV/s, eletrólito suporte TF (0,01 mol/L).

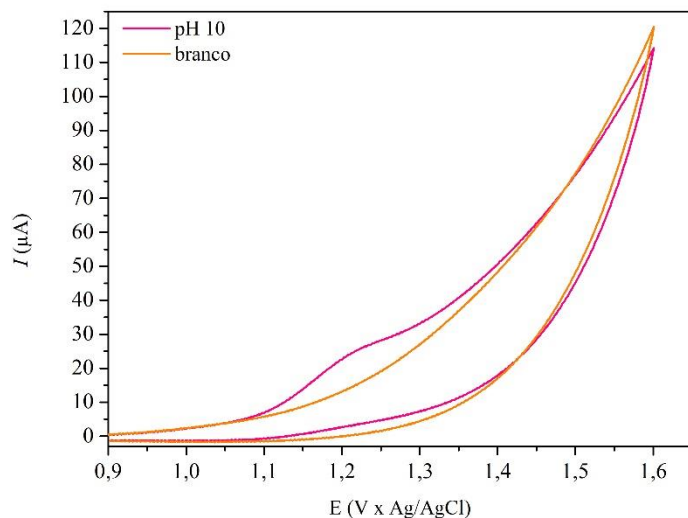


Figura A9: Voltamograma cíclico do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 10,0, realizado na faixa de potencial de 0,9 V a 1,6 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L), $\nu = 100$ mV/s, eletrólito suporte TF (0,01 mol/L).

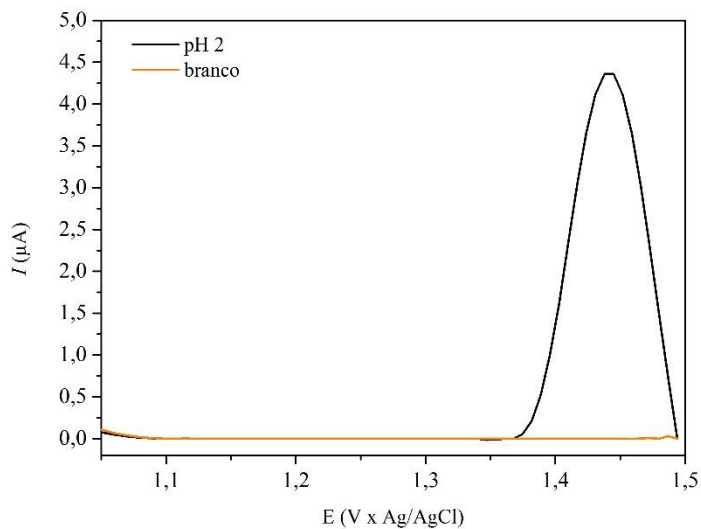


Figura A10: Voltamograma de pulso diferencial do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 2,0, realizado na faixa de potencial de 0,75 V a 1,5 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L). $a = 50$ mV, escada de potencial = 5 mV e $\nu = 50$ mV/s.

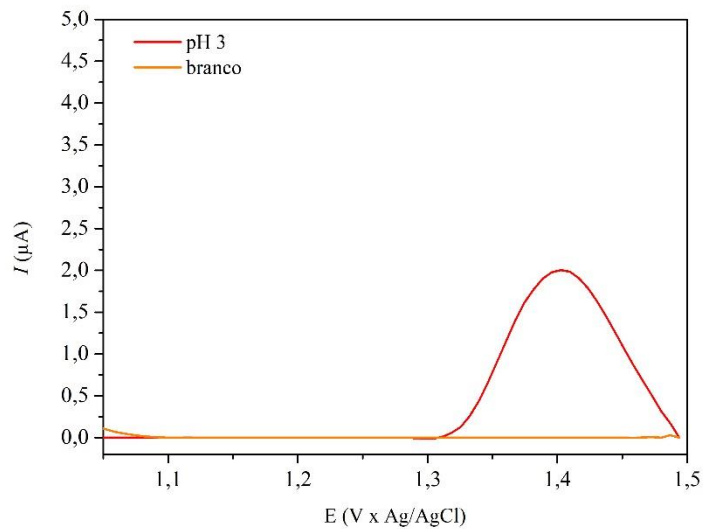


Figura A11: Voltamograma de pulso diferencial do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 3,0, realizado na faixa de potencial de 0,75 V a 1,5 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L). $a = 50$ mV, escada de potencial = 5 mV e $\nu = 50$ mV/s.

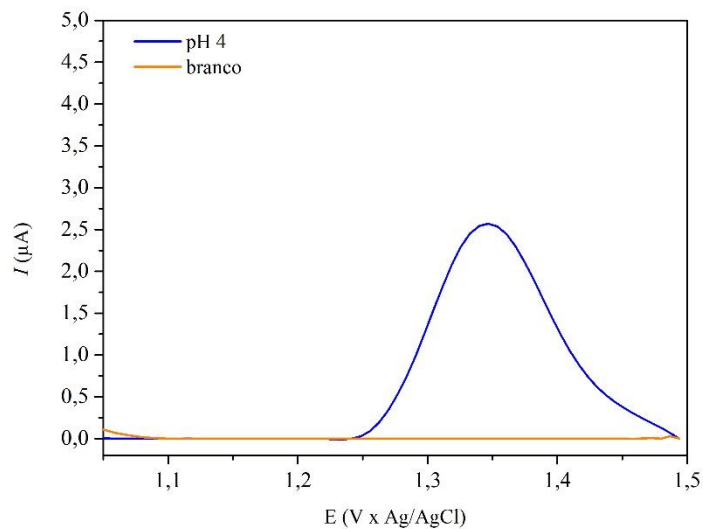


Figura A12: Voltamograma de pulso diferencial do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 4,0, realizado na faixa de potencial de 0,75 V a 1,5 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L). $a = 50$ mV, escada de potencial = 5 mV e $\nu = 50$ mV/s.

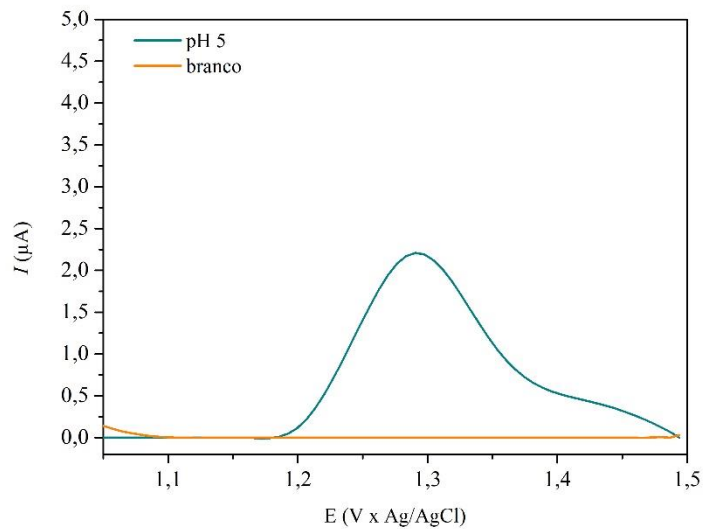


Figura A13: Voltamograma de pulso diferencial do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 5,0, realizado na faixa de potencial de 0,75 V a 1,5 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L). $a = 50$ mV, escada de potencial = 5 mV e $\nu = 50$ mV/s.

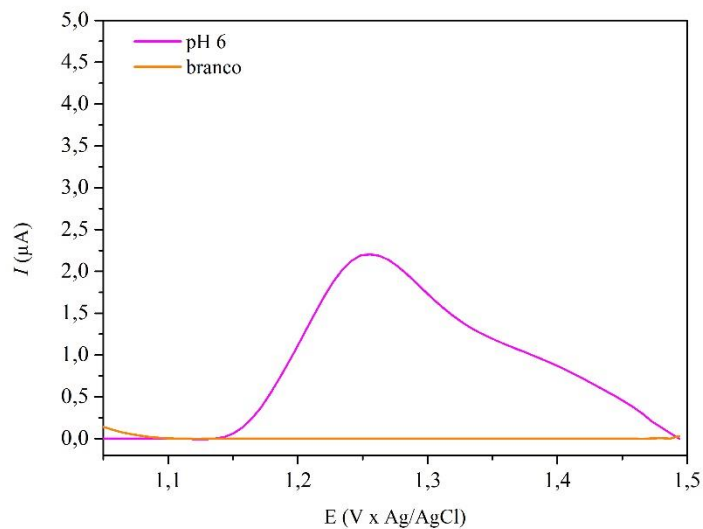


Figura A14: Voltamograma de pulso diferencial do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 6,0, realizado na faixa de potencial de 0,75 V a 1,5 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L). $a = 50$ mV, escada de potencial = 5 mV e $\nu = 50$ mV/s.

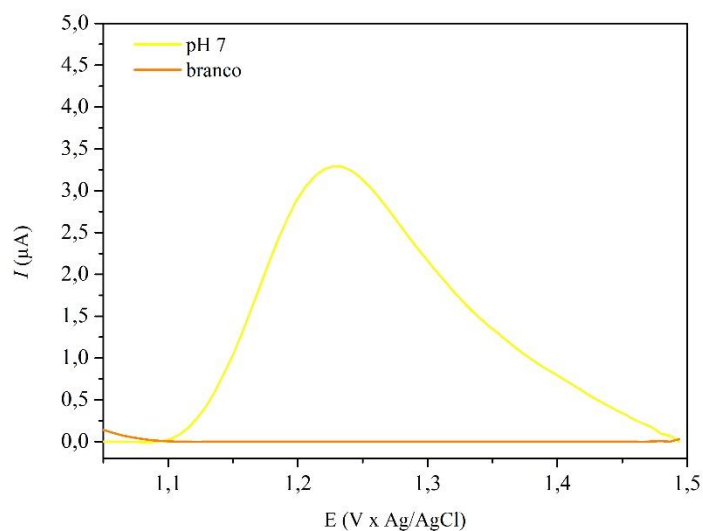


Figura A15: Voltamograma de pulso diferencial do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 7,0, realizado na faixa de potencial de 0,75 V a 1,5 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L). $a = 50$ mV, escada de potencial = 5 mV e $\nu = 50$ mV/s.

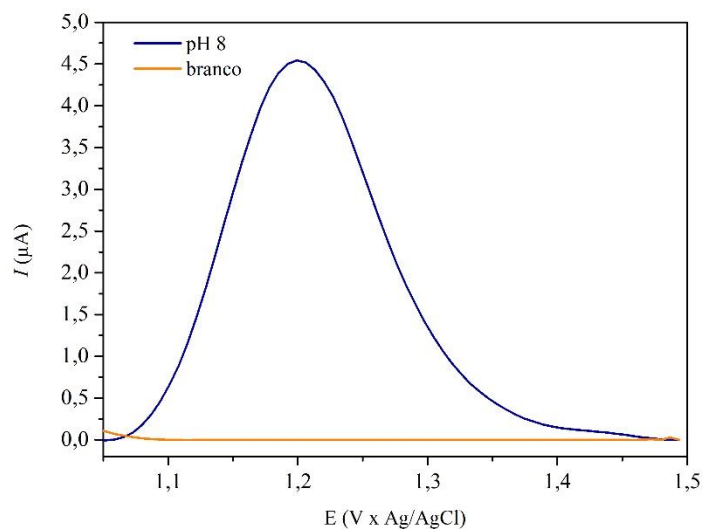


Figura A16: Voltamograma de pulso diferencial do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 8,0, realizado na faixa de potencial de 0,75 V a 1,5 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L). $a = 50$ mV, escada de potencial = 5 mV e $\nu = 50$ mV/s.

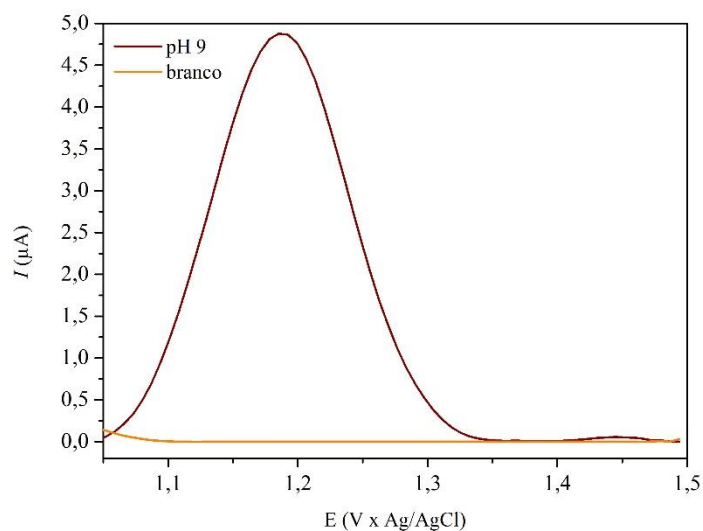


Figura A17: Voltamograma de pulso diferencial do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 9,0, realizado na faixa de potencial de 0,75 V a 1,5 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L). $a = 50$ mV, escada de potencial = 5 mV e $\nu = 50$ mV/s.

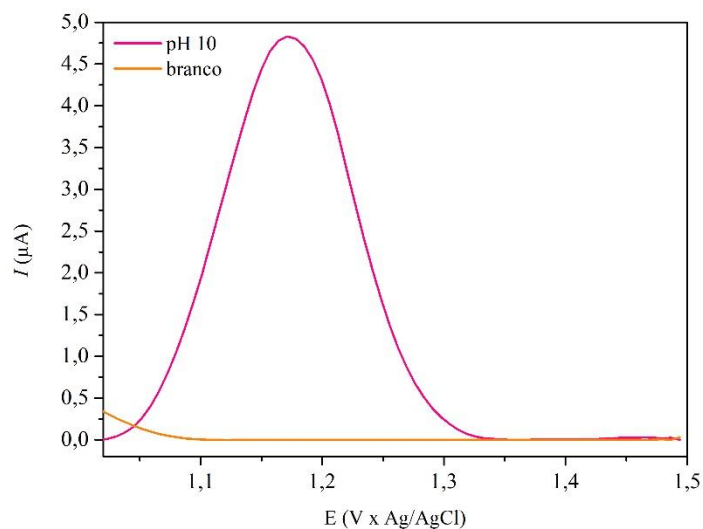


Figura A18: Voltamograma de pulso diferencial do TBZ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) em pH 10,0, realizado na faixa de potencial de 0,75 V a 1,5 V \times Ag/AgCl (3,0 mol/L). $a = 50$ mV, escada de potencial = 5 mV e $\nu = 50$ mV/s.