



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL CATALÃO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



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

Antônia Caixeta Neta

Catalão – GO
2019

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO 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 nº 9610/98, 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.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

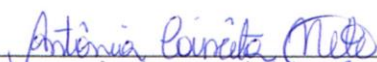
Nome completo do autor: Antônia Caixeta Neta

Título do trabalho: 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.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento **SIM** **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do orientador²

Data: 29 / 04 /2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados 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.

Versão atualizada em setembro de 2017.

² A assinatura deve ser escaneada.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL CATALÃO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

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

Antônia Caixeta Neta

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão, como exigência para obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientador: Dr. Leonardo Santos Andrade

Catalão – GO
2019

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

Caixeta Neta, Antônia

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 [manuscrito] / Antônia Caixeta Neta. - 2019.
xiv, 82 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Santos Andrade.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade Acadêmica Especial de Física e Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Catalão, 2019.

Bibliografia.

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

1. Tiabendazol. 2. Extração por Ponto Nuvem. 3. CLAE/EC. 4. VPD. 5. Eletrodo de Diamante. I. Santos Andrade, Leonardo, orient. II. Título.

CDU 544.6

Relatório de Defesa de Dissertação
Candidato(a): **Antônia Caixeta Neta**

Aos 29/03/2019 às 14:30 horas, realizou-se na Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Química a Defesa de Dissertação de Mestrado sob o título: “**DETERMINAÇÃO ELETROQUÍMICA DO AGROTÓXICO TIABENDAZOL EM AMOSTRAS DE TOMATE EXTRAÍDO E PRÉ-CONCENTRADO PELA TÉCNICA DE PONTO NUVEM USANDO ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO**” apresentada pelo candidato(a): **Antônia Caixeta Neta**. Ao final dos trabalhos a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

Participantes da Banca:	Função	Instituição
Prof. Dr. Leonardo Santos Andrade	Presidente	UFG - Catalão
Profa. Dra. Vanessa Nunes Alves	Titular	UFG - Catalão
Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz	Titular	UFU - Uberlândia

Resultado Final: Aprovada.

Parecer da Comissão Julgadora:

a candidata apresentou desempenho satisfatório, tanto no texto da dissertação quanto na apresentação e arguição.

Encerrada a sessão reservada, a presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar eu João Pedro Rocha de Carvalho, representante do Programa de Pós-Graduação em Química lavrei o presente relatório que será assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

Prof. Dr. Leonardo Santos Andrade

Profa. Dra. Vanessa Nunes Alves

Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz

Representante do PPG João Pedro Rocha de Carvalho
Assistente em Administração

() Não houve alteração no título.

(X) Houve. O novo título passa a ser:

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.



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química



Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de Dissertação de Mestrado do candidato(a) Antônia Calçeta Neta realizada em 29 de Março de 2019.

Prof. Dr. Leonardo Santos Andrade

Profa. Dra. Vanessa Nunes Alves

Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz

***“Um dia, quando olhar para trás, os anos
de luta lhe parecerão os mais bonitos.”***

Sigmund Freud

DEDICO

Dedico este trabalho as pessoas que me inspiram a ser melhor a cada dia. Meus melhores amigos e incentivadores. Pai e mãe, sem o apoio incondicional de vocês nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde, sabedoria e persistência ao longo dessa jornada.

Aos meus pais, José e Valda agradeço pelo amor incondicional e por sempre me incentivarem a buscar meus sonhos.

A minha tia Hilda, pela atenção e carinho independente da distância entre nós.

Ao meu noivo Felipe, obrigada pelo seu amor, sua disponibilidade e atenção. Você foi um companheiro essencial nessa etapa da minha vida. Agradeço também sua família pelo incentivo.

Aos meus tios Nilton César e Joana e a minha prima Pollyanna, vocês me acolheram e me fizeram sentir em casa, obrigada pelo carinho.

Ao meu orientador Prof. Leonardo, pelos ensinamentos, apoio e paciência ao longo dessa trajetória.

Quero fazer um agradecimento especial a Kamila, obrigada pela generosidade em dividir seus conhecimentos, pela paciência inabalável e por me ajudar a persistir no meu objetivo.

A Gabriela por me apoiar e incentivar nos momentos mais difíceis. Sua ajuda foi fundamental.

As colegas do grupo de pesquisa: Kamila, Gabriela, Lya, Larissa, Andréia, Mayra, Jordanna, agradeço pela motivação e os bons momentos proporcionados.

Aos meus amigos de mestrado Jordana, Thiago, Sabrina, Maira, Elizael, Murillo, Ruberney e Maylura obrigada pela troca de conhecimento e pelos momentos de alegria.

Aos colegas do LAPAM, obrigada pelo tempo que passamos juntos.

As minhas amigas Fernanda, Vanessa e Karoline por estar ao meu lado ao longo desses anos.

Aos membros da banca pelo aceite em participar na avaliação deste trabalho.

A Unidade Acadêmica Especial de Química da UFG-RC.

Aos órgãos de fomento, FAPEG, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho!

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

No Brasil, há um consumo significativo de tomate e, segundo o relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) disponibilizado pela ANVISA, o fungicida tiabendazol (TBZ) foi detectado em algumas amostras de tomate analisadas. A detecção desta substância é considerada irregular, já que o TBZ é autorizado somente para aplicação em sementes da planta e, portanto, não poderia ser encontrada em frutos. Assim, métodos eletroquímicos podem ser empregados para a determinação de agrotóxicos em amostras complexas e em níveis baixos de concentração, pois produzem medidas rápidas e confiáveis, consumindo pequenas quantidades de reagentes. Neste trabalho, um procedimento para determinação eletroanalítica do fungicida TBZ em frutos de tomate usando eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) a partir da técnica de extração e pré-concentração por ponto nuvem (EPN) foi desenvolvido e validado. A técnica de análise utilizada nesta determinação foi a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um detector eletroquímico (CLAE/EC), com eletrodo de DDB. Com o objetivo de avaliar as principais variáveis do processo de EPN, utilizou-se um planejamento fatorial 2^4 completo. A condição otimizada da EPN foi atingida pelo uso de Tergitol (19% v/v), NaCl (0,83 g), por um tempo de agitação ultrassônica de 15 min e temperatura de 36 °C. Sob estas condições, o fator de pré-concentração obtido foi de 5,7. Os limites de detecção e quantificação foram de $2,7 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e $5,5 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, respectivamente. As recuperações médias variaram entre 80,7% e 115,1% e a precisão (média de três dias) foi inferior a 15%, o que demonstra a boa exatidão e precisão do método desenvolvido. Na aplicação do método em tomates comerciais, o TBZ foi detectado em uma das três amostras analisadas. A técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD) também foi investigada para determinação eletroanalítica do fungicida TBZ em frutos de tomate (extraído e pré-concentrado por EPN) usando eletrodo de DDB com a finalidade de aumentar a frequência analítica. Com a técnica de VPD a frequência analítica aumentou em aproximadamente 90 vezes comparado à técnica de CLAE/EC.

Palavras-Chave: Tiabendazol, Extração por Ponto Nuvem, CLAE/EC, VPD, Eletrodo de Diamante.

ABSTRACT

In Brazil, there is a significant consumption of tomatoes and, according to the report of the Program of Analysis of the Residues of Agrochemicals in Food (PARA) available by ANVISA, the tiabendazole (TBZ) fungicide was detected in some tomato samples analyzed. The detection of this substance is considered to be prohibited, since the TBZ is authorized only for application in seeds of the plant and, therefore, could not be found in fruits. Thus, electrochemical methods can be used for the determination of pesticides in complex samples and in low concentration levels, because they produce fast and reliable measurements, consuming small amounts of reagents. In this work, a procedure for the electroanalytical determination of TBZ fungicide in tomato fruits using boron-doped diamond electrode (BDD) was developed and validated using the cloud extraction and preconcentration (CPE) technique. The analytical technique used in this determination was the High Performance Liquid Chromatography coupled to an electrochemical detector (HPLC-EC), by the use of the BDD electrode. In order to evaluate the main variables of the CPE process, it was used a 2^4 complete factorial planning to optimize the parameters. The CPE optimized condition was achieved by the use of Tergitol (19% V/V), NaCl (0.83 g), ultrasonic stirring time of 15 min and temperature of 36 °C. Under these conditions, the preconcentration factor obtained was 5.7. The limits of detection and quantification obtained were 2.7×10^{-8} mol L⁻¹ and 5.5×10^{-8} mol L⁻¹, respectively. The average recoveries obtained in 3 days were satisfactory, varying between 80.7% and 115.1%, which demonstrates the good accuracy of the developed method. In the application of the method in commercial tomatoes, TBZ was detected in one of the samples analyzed. The differential pulse voltammetry (DPV) technique was also investigated for the electroanalytical determination of TBZ fungicide in tomato fruit (extracted and pre-concentrated by CPE) using BDD electrode in order to increase the analytical frequency. The use of DPV technique increased the analytical frequency by approximately 90 times compared to the HPLC/EC technique.

Keywords: Thiabendazole, Cloud Point Extraction, HPLC-EC, DPV, Diamond Electrode.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Consumo de agrotóxicos e afins (em toneladas de ingredientes ativos, IA) no Brasil no período de 2000 a 2016.....	3
FIGURA 2: Estrutura química do TBZ.....	4
FIGURA 3: Voltametria cíclica: variação de potencial com o tempo na forma de uma onda triangular.....	9
FIGURA 4: Voltamograma cíclico para uma reação reversa.....	10
FIGURA 5: a) Programação da aplicação de pulso na VPD e b) Representação esquemática de um voltamograma de VPD típico.....	12
FIGURA 6: Representação esquemática da formação de um agregado micelar.....	19
FIGURA 7: Representação esquemática da extração em ponto nuvem.....	19
FIGURA 8: Fotos do cultivo e colheita da matriz orgânica (tomate)	25
FIGURA 9: Suporte de teflon para o eletrodo de trabalho (DDB): (A) suporte aberto mostrando o compartimento onde o eletrodo de trabalho é colocado (B) eletrodo de DDB sendo colocado no suporte e (C) suporte fechado pronto para ser usado nas análises eletroquímicas	26
FIGURA 10: Fotografia da célula eletroquímica convencional de três eletrodos: contra eletrodo (CE), eletrodo de referência (ER) e eletrodo de trabalho (ET).	26
FIGURA 11: Fotos das etapas iniciais da EPN. a) Polpa do tomate com água; b) Amostra após 5 min na centrífuga; c) Alíquota do sobrenadante.....	29
FIGURA 12: Fotos da EPN. a) Amostras no banho termostático; b) Após adição de 0,6 g de NaCl e c) Amostras após separação de fases.....	30
FIGURA 13: Foto do sistema acoplado CLAE/EC usado para a detecção e quantificação do TBZ.	32
FIGURA 14: (I) Representação esquemática e (II) foto ilustrativo do sensor eletroquímico utilizado nas análises por CLAE/EC	33
FIGURA 15: Voltamogramas cíclicos do fungicida TBZ $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes pH (de 2 a 11). Eletrodo de DDB. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$	39

- FIGURA 16:** a) Voltamogramas de VPD do fungicida TBZ $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes pH (de 2 a 11) e b) Relação $I_{p_a} \times \text{pH}$ e $E_p \times \text{pH}$ obtidos da VPD do TBZ ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). $a = 50 \text{ mV}$, escada de potencial = 5 mV e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$40
- FIGURA 17:** Diagrama de distribuição das espécies em função do pH para TBZ (●) TBZ^+ , (■) TBZ e (▲) TBZ^-41
- FIGURA 18:** Estruturas químicas das espécies formadas em diferentes valores de pH.
.....42
- FIGURA 19:** Cromatogramas obtidos por detecção eletroquímica após EPN em tomate fortificado com $500 \mu\text{L}$ de TBZ ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$). Eletrólito suporte: fase móvel tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0):ACN em diferentes composições de fase móvel. $E = 1,5 \text{ V}$ x Ag/AgCl. Volume de injeção de $20 \mu\text{L}$44
- FIGURA 20:** Cromatogramas obtidos por detecção eletroquímica após procedimento de EPN em tomate na ausência de TBZ (branco, curva em azul), na presença de TBZ (curva em vermelho) e após fortificação da amostra com adição de $50 \mu\text{L}$ solução padrão de TBZ (curva em preto). Eletrólito suporte: fase móvel tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0):ACN na proporção 57:43 (V/V), volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ e $E = 1,5 \text{ V}$ x Ag/AgCl.....45
- FIGURA 21:** Cromatogramas obtidos por CLAE-UV após procedimento de EPN em tomate na ausência de TBZ (branco, curva em azul), na presença de TBZ (curva em vermelho) e após fortificação da amostra com adição de $50 \mu\text{L}$ solução padrão de TBZ (curva em preto). Eletrólito suporte: fase móvel tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0):ACN na proporção 57:43 (V/V), volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ e $\lambda=274 \text{ nm}$46
- FIGURA 22:** Cromatogramas obtidos por detecção eletroquímica após EPN e na figura inserida encontra-se voltamograma hidrodinâmico obtido para o TBZ. Eletrólito suporte: fase móvel tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0):ACN na proporção 57:43 (V/V) e volume de injeção de $20 \mu\text{L}$47
- FIGURA 23:** Cromatogramas obtidos por detecção eletroquímica após EPN em tomate contendo $500 \mu\text{L}$ de TBZ ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$) em diferentes pH de sobrenadante do tomate. Eletrólito suporte: fase móvel tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0):ACN na proporção de 57:43 (V/V), volume de injeção de $20 \mu\text{L}$. $E = 1,35 \text{ V}$ x Ag/AgCl.....48
- FIGURA 24:** Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento fatorial 2^4 completo referente aos efeitos para as variáveis da EPN em tomate fortificado com TBZ. A resposta utilizada foi o sinal de corrente. Nível de confiança de 95%.52
- FIGURA 25:** Superfície de resposta obtida a partir dos resultados da TABELA 6, para otimização do teor de Tergitol TNM-6 e da quantidade de NaCl, tendo como resposta analítica o sinal de corrente do TBZ.....53

- FIGURA 26:** Superfície de resposta obtida a partir dos resultados da TABELA 7 para otimização do teor de Tergitol TNM-6 e da quantidade de NaCl, tendo como resposta analítica o sinal de corrente do TBZ.....55
- FIGURA 27:** Curva analítica obtida em condição otimizada com procedimento de EPN. Eletrólito suporte: fase móvel tampão fosfato (0,01 mol L⁻¹, pH 7,0):ACN na proporção 57:43 (V/V), volume de injeção de 20 µL. $E = 1,35 \text{ V x Ag/AgCl}$57
- FIGURA 28:** Curva analítica obtida em condição otimizada sem procedimento de EPN. Eletrólito suporte: fase móvel tampão fosfato (0,01 mol L⁻¹, pH 7,0):ACN na proporção 57:43 (V/V), volume de injeção de 20 µL. $E = 1,35 \text{ V x Ag/AgCl}$57
- FIGURA 29:** Cromatograma obtidos por detecção eletroquímica referente à determinação do limite de detecção do TBZ. Eletrólito suporte: fase móvel de tampão fosfato (0,01 mol L⁻¹, pH 7,0):ACN na proporção de 57:43 (V/V), volume de injeção de 20 µL. $E = 1,35 \text{ V x Ag/AgCl}$58
- FIGURA 30:** Cromatogramas obtidos por detecção eletroquímica referente à EPN em condição otimizada em tomate orgânico (pH 7). Eletrólito suporte: fase móvel de tampão fosfato (0,01 mol L⁻¹, pH 7):ACN na proporção de 57:43 (V/V), volume de injeção de 20 µL. $E = 1,35 \text{ V x Ag/AgCl}$60
- FIGURA 31:** Cromatograma obtido por CLAE-UV referente à EPN em condição otimizada em tomate orgânico (pH 7) adicionando 1,0 µg mL⁻¹ de TBZ e 100 µg mL⁻¹ de CPF. Fase móvel tampão fosfato (0,01 mol L⁻¹, pH 7):ACN na proporção de 57:43 (V/V), volume de injeção de 20 µL e $\lambda = 274 \text{ nm}$62
- FIGURA 32:** Cromatogramas obtidos por detecção eletroquímica referente à EPN em condição otimizada para o tomate Comercial 01 (pH 7) adicionando 25 µL de solução padrão de TBZ 1,0 µg mL⁻¹ (—) e seu respectivo branco (—). Eletrólito suporte: fase móvel tampão fosfato (0,01 mol L⁻¹, pH 7):ACN na proporção de 57/43 (V/V), volume de injeção de 20 µL. $E = 1,35 \text{ V x Ag/AgCl}$63
- FIGURA 33:** (a) Cromatogramas obtidos por detecção eletroquímica referente à EPN em condição otimizada em tomate comercial 02 (pH 7) adicionando 25 µL de solução padrão de TBZ 1,0 µg mL⁻¹ (—) e seu respectivo branco (—). Eletrólito suporte: fase móvel tampão fosfato (0,01 mol L⁻¹, pH 7):ACN na proporção de 57/43 (V/V), volume de injeção de 20 µL. $E = 1,35 \text{ V x Ag/AgCl}$. (b) Região ampliada onde se encontra o sinal analítico do TBZ na amostra do branco.63
- FIGURA 34:** (a) Cromatogramas obtidos por CLAE-UV referente à EPN em condição otimizada em tomate comercial 02 (pH 7) adicionando 25 µL de solução padrão de TBZ 1,0 µg mL⁻¹ (—) e seu respectivo branco (—). Eletrólito suporte: fase móvel tampão fosfato (0,01 mol L⁻¹, pH 7):ACN na proporção de 57/43 (V/V), volume de injeção de 20 µL. $E = 1,35 \text{ V x Ag/AgCl}$. (b) Região ampliada onde se encontra o sinal analítico do TBZ na amostra do branco.64

FIGURA 35: Cromatogramas obtidos por detecção eletroquímica referente à EPN em condição otimizada em tomate comercial 03 (pH 7) adicionando 25 μL de solução padrão de TBZ $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (—) e seu respectivo branco (---). Eletrólito suporte: fase móvel tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7):ACN na proporção de 57/43 (V/V), volume de injeção de 20 μL . $E = 1,35 \text{ V x Ag/AgCl}$64

FIGURA 36: Voltamogramas de pulso diferencial com variação de amplitude de 10 mV a 100 mV obtidos para TBZ na concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0). Escada de potencial de 5 mV, tempo de intervalo de pulso de 0,1 s. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$66

FIGURA 37: Voltamogramas de pulso diferencial com variação da escada de potencial entre 1 mV a 10 mV (ou 10 mV s^{-1} a 100 mV s^{-1}) para TBZ $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0). $a = 60 \text{ mV}$ e tempo de intervalo de pulso de 0,1 s. 67

FIGURA 38: Voltamogramas de pulso diferencial obtido no teste de repetitividade. TBZ ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2). $a =$ de 60 mV, escada de potencial de 7 mV ($v = 70 \text{ mV s}^{-1}$).68

FIGURA 39: Voltamogramas obtidos por VPD referentes à determinação do LD e LQ para a determinação do TBZ. Eletrólito suporte: tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2). $a = 60 \text{ mV}$, escada de potencial de 7 mV ($v = 70 \text{ mV s}^{-1}$).69

FIGURA 40: Curva analítica obtida em condição otimizada da VPD para determinação de TBZ em meio de tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2). $a = 60 \text{ mV}$, escada de potencial de 7 mV ($v = 70 \text{ mV s}^{-1}$).69

FIGURA 41: Voltamograma de pulso diferencial para TBZ em meio de tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2) obtidos após procedimento de EPN em tomate orgânico (—) e obtidos após procedimento de EPN em tomate orgânico com adição de TBZ (---) (C_{ad} de $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). $a = 60 \text{ mV}$, escada de potencial de 7 mV ($v = 70 \text{ mV s}^{-1}$)70

FIGURA 42: Voltamogramas de pulso diferencial para TBZ em meio de tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2) obtidos após procedimento de EPN em tomate (C_{ad} de $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e extração fortificada com solução padrão de TBZ. $a = 60 \text{ mV}$, escada de potencial de 7 mV ($v = 70 \text{ mV s}^{-1}$)72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Classes agronômicas dos agrotóxicos	2
TABELA 2: Classificação toxicológica dos agrotóxicos	2
TABELA 3: Propriedades do fungicida TBZ	5
TABELA 4: Parâmetros do surfactante Tergitol TMN-6	20
TABELA 5: Resultado do planejamento fatorial 2^4 para estudo da extração e pré-concentração por ponto nuvem do TBZ em tomate	50
TABELA 6: Resultado do planejamento de composto central para estudo da extração e pré-concentração por ponto nuvem do TBZ em tomate	53
TABELA 7: Resultado do planejamento de composto central para estudo da extração e pré-concentração por ponto nuvem do TBZ em tomate	54
TABELA 8: Condições finais otimizadas para extração e pré-concentração do TBZ por ponto nuvem em tomate	55
TABELA 9: LD e LQ relatados na literatura referentes à determinação de TBZ em várias matrizes, utilizando diferentes métodos de extração e análise	58
TABELA 10: Exatidão (%) e precisão (\pm %) intradia e interdia obtidos na determinação do TBZ em amostras de tomate na EPN em três níveis de concentração. Eletrólito suporte: fase móvel de tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7):ACN na proporção de 57:43 (V/V), volume de injeção de $20 \mu\text{L}$. $E = 1,35 \text{ V}$ x Ag/AgCl	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABRASCO - Associação Brasileira de Saúde Coletiva

ACN - Acetonitrila

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

C_{ad} - Concentração adicionada

CLAE/EC - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector eletroquímico

CMC - Concentração micelar crítica

C_{ob} - Concentração obtida

CPF - Clorpirifós

CV - Coeficiente de variação

DDB - Diamante Dopado com Boro

E - Potencial

EPN - Extração por Ponto Nuvem

F_C - Fator de pré-concentração

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IDA - Ingestão diária aceitável

Ipa - Corrente de pico anódico

LD - Limite de detecção

LMR - Limite máximo de resíduos

LQ - Limite de quantificação

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

pH - Potencial hidrogeniônico

R% - Recuperação percentual

TBZ - Tiabendazol

TF - Tampão fosfato

VC - Voltametria Cíclica

VPD - Voltametria de Pulso Diferencial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 AGROTÓXICO: ASPECTOS GERAIS	1
1.2 AGROTÓXICO BENZIMIDAZOL: TIABENDAZOL	4
1.3 TOMATE.....	6
1.4 TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS	8
1.4.1 VOLTAMETRIA CÍCLICA (VC).....	8
1.4.2 VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL.....	11
1.5 ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO (DDB).....	12
1.6 CLAE/EC.....	13
1.7 EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM.....	17
2 OBJETIVO	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 PARTE EXPERIMENTAL	24
3.1 MATERIAIS E REAGENTES	24
3.2 MATRIZ ORGÂNICA: PLANTAÇÃO E CULTIVO DO TOMATE	24
3.3 MATERIAIS E INSTRUMENTOS PARA MEDIDAS ELETROQUÍMICAS	25
3.3.1 SISTEMA ELETROQUÍMICO.....	25
3.3.2 ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO (DDB).....	26
3.4 PRÉ-TRATAMENTO DO ELETRODO DE DDB.....	27
3.5 COMPORTAMENTO DO TBZ SOBRE O ELETRODO DE DDB	27
3.5.1 VOLTAMETRIA CÍCLICA.....	27
3.5.2 VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL.....	28
3.6 EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM.....	28
3.6.1 FATOR DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO.....	30
3.6.2 VARIAÇÃO DO pH DO TOMATE.....	31
3.6.3 PLANEJAMENTO FATORIAL	31
3.6.4 PLANEJAMENTO DE COMPOSTO CENTRAL.....	32

3.7 CLAE/EC.....	32
3.7.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	32
3.7.2 VOLTAMOGRAMA HIDRODINÂMICO.....	33
3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	34
3.8.1 CLAE/EC	34
3.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM TOMATES COMERCIAIS	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 PERFIL E CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO TBZ.....	39
4.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	43
4.2.1 VOLTAMOGRAMA HIDRODINÂMICO.....	46
4.3 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA EPN.....	48
4.3.1 VARIAÇÃO DO pH DO SOBRENADANTE.....	48
4.3.2 PLANEJAMENTO FATORIAL.....	49
4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	56
4.4.1 CLAE/EC	56
4.4.2 VPD.....	65
5 CONCLUSÃO.....	73
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 AGROTÓXICOS: ASPECTOS GERAIS

Agrotóxicos, pesticidas, praguicidas e defensivos agrícolas são designações genéricas para os vários produtos químicos usados na agricultura com o objetivo de controlar pragas e doenças nas plantas de interesse comercial. Nesse sentido, o uso dos agrotóxicos mantém o controle sobre as pragas nas culturas agrícolas, ampliando a produção de alimentos para garantir o atendimento à demanda de uma população humana cada vez maior (JARDIM, ANDRADE e QUEIROZ, 2009).

Com o passar dos anos, o país aumentou suas fronteiras agrícolas, número de safras por ano e intensificou o uso da irrigação, visando o aumento da produtividade de alimento (RODRIGUES, 2006). Portanto, os agrotóxicos têm participação significativa no modelo de desenvolvimento da agricultura do Brasil. Entretanto, em função da alta toxicidade, eliminação de resíduos/embalagem, controle, inspeção e monitoramento, existe um grande número de normas brasileiras para legalizar e garantir seu uso de forma correta. O referencial mais importante é a Lei nº 7802/89, que rege o processo de registro de um produto agrotóxico, regulamentada pelo Decreto nº 4074/02 (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2018).

A Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) traz como definição de agrotóxico:

Agrotóxico é o termo legal e está definido na Lei 7802/89, também chamada Lei de Agrotóxicos. Os termos pesticida, praguicida e defensivo agrícola também são utilizados. A palavra está associada ao setor que a emprega: por exemplo, as empresas de agrotóxicos preferem utilizar “defensivos agrícolas” já que na visão deles os produtos são utilizados com o objetivo de proteger a produção agrícola. A Anvisa usa a palavra “agrotóxicos”, que traduz bem os riscos potenciais do produto e alerta os trabalhadores e a população. “Praguicida” é derivado de *plaguicidas*, denominação utilizada pelos países de língua espanhola e “pesticida” tem como equivalente o termo *pesticide*, utilizado na língua inglesa.

No Brasil, o Sistema Nacional de Registro de Agrotóxicos, conta com três órgãos competentes responsáveis pela regulamentação e fiscalização de produtos agrotóxicos e

afins no país: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA).

Conforme sua função, os agrotóxicos podem ser divididos em classes. Alguns exemplos são demonstrados na TABELA 1.

TABELA 1: Classes agronômicas dos agrotóxicos

<i>Classe agronômica</i>	<i>Função de controle</i>
Inseticidas	Insetos
Acaricidas	Ácaros
Nematicidas	Nematóides
Fungicidas	Fungos
Herbicidas	Plantas daninhas

Fonte: ANVISA

Quanto à toxicidade, os agrotóxicos são divididos de acordo com a classe, classificação toxicológica e cor de identificação, tal como descrito na TABELA 2. Estas informações devem ser obrigatoriamente por lei, expostas nos rótulos de embalagem dos produtos.

TABELA 2: Classificação toxicológica dos agrotóxicos

<i>Classe</i>	<i>Classificação toxicológica</i>	<i>Cor de identificação</i>
Classe I	Extremamente Tóxico	Vermelha
Classe II	Altamente Tóxico	Amarela
Classe III	Medianamente Tóxico	Azul
Classe IV	Pouco Tóxico	Verde

Fonte: ANVISA

Amorello & Orecchio (2013) enfatizam a importância de um controle mais eficiente que contribua para a prática do uso correto dos agrotóxicos, pois a exposição a estes

compostos tem sido associada ao desenvolvimento de vários efeitos negativos sobre a saúde humana e o meio ambiente.

O principal problema relacionado aos agrotóxicos está relacionado ao seu mau uso, como por exemplo, o desrespeito à forma correta de manuseio e aplicação, o uso de dosagens incorretas ou o uso em plantações e fase de cultivo não indicados para o produto. Assim tanto os alimentos quanto o meio ambiente podem receber níveis de resíduos muito acima dos recomendados por lei (COSTA et al., 2017).

A falta de conscientização dos aplicadores e/ou da fiscalização dos órgãos reguladores quanto ao uso correto dos equipamentos de proteção individual (EPI's) proporcionam o aspecto mais visível do impacto na saúde humana, pois nestes casos a intoxicação ocorre de forma direta, muitas vezes com o aparecimento dos sintomas logo após a exposição (FRANÇA et al., 2012).

Dependendo do tempo que permanece disponível no meio ambiente e de sua toxicidade, os agrotóxicos podem interferir em processos básicos do ecossistema, tais como a respiração do solo, a ciclagem de nutrientes, a mortalidade e redução das populações de peixes ou aves, entre outros efeitos (IBAMA, 2009).

Os números expressivos de consumo de agrotóxicos no país são evidenciados na FIGURA 1.

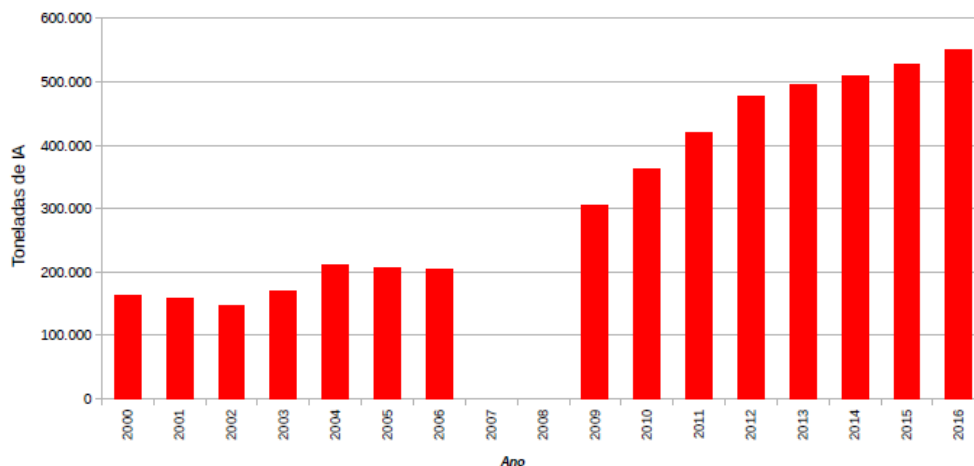


FIGURA 1. Consumo de agrotóxicos e afins (em toneladas de ingredientes ativos, IA) no Brasil no período de 2000 a 2016. Fonte: IBAMA, 2017.

Os dados mostrados na FIGURA 1 são divulgados pelo IBAMA e foram atualizados em 17 de outubro de 2017. São dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos

técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto 4.074/2002. Essas informações confirmam o crescimento contínuo do consumo de produtos agrotóxicos e afins no Brasil nos últimos anos.

O dossiê da Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO) faz um alerta sobre o impacto dos agrotóxicos na saúde, onde 70% dos alimentos *in natura* consumidos no país estão contaminados por agrotóxicos. Desses 70%, de acordo com a ANVISA, 28% contêm substâncias não autorizadas.

Além dos inúmeros problemas que os agrotóxicos causam ao meio ambiente, é necessário discutir os efeitos causados nos seres humanos. Portanto, conforme o exposto, além de leis mais eficientes para o controle e comercialização desse tipo de produto no Brasil, fica evidente a necessidade de estudos mais aprimorados para o desenvolvimento de técnicas rápidas e baratas capazes de detectar e quantificar a presença de resíduos de agrotóxicos acima do permitido nos alimentos de origem vegetal.

1.2 AGROTÓXICO BENZIMIDAZOL: TIABENDAZOL

Os benzimidazóis são substâncias amplamente usadas como fungicidas vegetais de amplo espectro na agricultura desde a década de 1960. O tiabendazol (TBZ) foi desenvolvido por Merck & Co. Inc em 1962, inicialmente como anti-helmíntico usado na medicina humana e veterinária, e em 1968 passou a ser utilizado na agricultura como fungicida (OLIVEIRA & TOLEDO, 1999). O mecanismo de ação do TBZ ocorre por meio da inibição da mitose e divisão celular, e tem como sítio alvo a inibição da biossíntese da proteína tubulina (RODRIGUES, 2006). No Brasil, o TBZ é registrado com a marca comercial Tecto SC[®] (AGROFIT, 2018). Na FIGURA 2 encontra-se a estrutura química do TBZ.

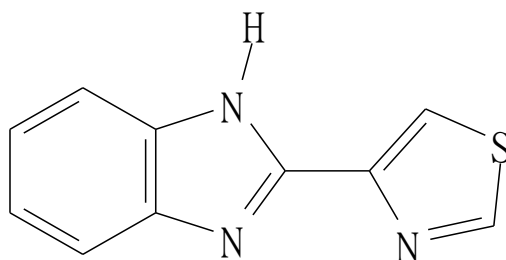


FIGURA 2: Estrutura química do TBZ. Fonte: KOUKOUVINOS et al., 2017.

Além do uso médico, os seres humanos são submetidos à exposição por meio da alimentação, porque atualmente o TBZ é amplamente utilizado como fungicida na pós-colheita em frutas e vegetais (FENG et al., 2018; HENEBERGA, SVOBODAB e PECH, 2018). O TBZ é geralmente considerado de baixa toxicidade aguda, no entanto tem demonstrado causar sérios danos à saúde caso se acumule no organismo. Ekman et al. (2014) e Fu et al. (2019) advertem que o TBZ é considerado uma preocupação toxicológica devido aos vários efeitos relatados em mamíferos, tais como nefrogênicos, hepatogênicos, teratogênicos e neurológicos. Além disso, de acordo com Séide et al. (2016) o TBZ tem demonstrado causar sérios danos ao fígado e foi classificado como potencialmente carcinogênico. Na TABELA 3 é possível visualizar algumas informações do fungicida tiabendazol.

TABELA 3: Propriedades do fungicida TBZ

Ingrediente ativo ou nome comum:	Tiabendazol (Thiabendazole)
Nº CAS	148-79-8
Nome químico	2-(thiazol-4-yl) benzimidazole
Grupo químico	Benzimidazol
Classe	Fungicida
Massa Molar	201,249 g mol ⁻¹

Fonte: ANVISA

De acordo com a ANVISA, o fungicida tiabendazol é indicado na aplicação foliar nas culturas de abacate, abacaxi, banana, citros, coco, ervilha, feijão-vagem, maçã, mamão, manga, maracujá, melão, pimentão e pera, e a aplicação em sementes de acelga, alface, arroz, batata (tubérculos), cebola, cenoura, chicória, espinafre, feijão, girassol, melancia, melão, milho, rúcula, soja, sorgo e tomate (ANVISA, 2018).

O uso indiscriminado de agrotóxicos para garantir produtos de qualidade e com a maior lucratividade possível é muito intenso no cultivo agrícola. Assim, torna-se essencial o investimento em pesquisas para que ocorram avanços nos métodos que determinem e

auxiliem no controle de agrotóxicos presentes nos alimentos que estão sendo consumidos nos lares brasileiros.

Para maior fiscalização, a ANVISA criou o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), com o objetivo de monitorar os níveis de agrotóxicos que chegam à mesa do consumidor. A agência é responsável pela avaliação de risco dietético, por meio dos parâmetros de Limite Máximo de Resíduos (LMR) e Ingestão Diária Aceitável (IDA) que estão entrelaçados e são determinados de maneira que não afetem a saúde dos consumidores. A IDA, para cada um dos ingredientes ativos de agrotóxicos autorizados no Brasil, é a quantidade máxima que uma pessoa pode ingerir diariamente, durante toda a vida, sem que sofra danos à saúde decorrentes desta ingestão.

A ANVISA também define o LMR a partir dos resultados de estudos de campo, ou seja, a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico que pode estar presente em cada cultura após aplicação do mesmo em uma fase específica, seguindo as Boas Práticas Agrícolas, desde sua produção até o consumo. Por meio de estudos toxicológicos, poderá haver alteração da IDA e/ou do LMR sempre que houver novas evidências.

1.3 TOMATE

Na atualidade, os agrotóxicos geram inúmeros benefícios aos seres humanos por possibilitar o controle contínuo de pragas e doenças nas lavouras, aumentando o rendimento agrícola. Porém, seu uso intensivo e indiscriminado na agricultura gera impactos negativos resultantes da contaminação do solo, da água e do ar, além da contaminação humana por meio da alimentação.

A população brasileira consome regularmente uma quantidade significativa de tomate devido à grande produção nacional, facilidade de consumo *in natura* ou industrializado e aos preços acessíveis. O tomate é considerado um alimento funcional porque contém antioxidantes, tais como ácido ascórbico, vitamina E, carotenóides, flavonóides, licopeno e ácidos fenólicos que geram benefícios para a saúde humana. Assim, considerando-se o hábito do brasileiro no consumo do fruto *in natura*, principalmente em saladas e sanduíches, é de suma importância à inocuidade do produto (SCHIAVON et al., 2013; ANDRADE et al., 2015).

O cultivo do tomate, seja de mesa ou para processamento industrial, é uma das atividades agrícolas mais difíceis de ser realizada sem o uso de agrotóxicos, devido à alta incidência e susceptibilidade a pragas e doenças. A classe agrônômica mais utilizada na cultura do tomate são os fungicidas (ALVES et al., 2010).

Em relação à exposição aos agrotóxicos e por serem necessárias várias práticas agrônômicas para a sua produção, os tomates estão classificados dentro do grupo de alto risco. Os frutos são uns dos alimentos que mais recebem pulverizações de agrotóxicos, gerando problemas de saúde pública. Além disso, as altas taxas residuais dessas substâncias nos frutos podem causar intoxicação alimentar decorrente do seu consumo (SILVA et al., 2005; CARDOSO et al., 2010).

Dentre os estados brasileiros, Goiás é o maior produtor de tomate, seguido dos estados de São Paulo e de Minas Gerais que, juntos, respondem por 57% da produção brasileira. A maior parte dessa produção está voltada para o chamado “tomate de mesa”. Entretanto, a produção de tomate destinada à indústria de processamento tem chamado a atenção por sua importância crescente no cenário nacional. O segmento brasileiro de tomate para processamento industrial conquistou produção de aproximadamente 1,82 milhões de toneladas no ano de 2010, valor 58% maior se comparado à produção obtida em 2000. Diante desse resultado, o Brasil passou a ocupar o quinto lugar entre os maiores produtores do setor, com destaque para o estado de Goiás, que responde por cerca de 80% da produção nacional desse segmento (MOURA et al., 2014).

Segundo pesquisa realizada por Latorraca et al. (2008), os agrotóxicos mais utilizados na região de Goiânia e Goianópolis-GO são das classes inseticidas e fungicidas. Além disso, de acordo com o relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), o fungicida TBZ foi detectado em algumas amostras de tomate analisadas. No entanto, essa detecção é considerada irregular pelo fato do TBZ ser autorizado somente para aplicação em sementes de tomate (ANVISA, 2016). Nesse contexto, é necessária maior atenção com os agrotóxicos utilizados no cultivo do tomate, além de priorizar o desenvolvimento de metodologias simples e de baixo custo para monitorar sua utilização e garantir um alimento seguro.

1.4 TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS

Os avanços tecnológicos ocorridos nas últimas décadas permitiram o desenvolvimento de técnicas eletroquímicas de análise, especialmente a viabilização da instrumentação alcançada com a evolução da informática. A possibilidade de interfaceamento com equipamentos eletroquímicos para o controle digital da perturbação imposta ao eletrodo de trabalho, assim como da medida do sinal resultante, possibilitou o desenvolvimento das técnicas voltamétricas, em especial, das técnicas de pulso que, na década de 50, começaram a substituir as técnicas polarográficas até então utilizadas (SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003).

1.4.1 VOLTAMETRIA CÍCLICA (VC)

Desde a década de 80 do século passado, a voltametria cíclica tem sido reconhecida como um dos métodos eletroquímicos mais populares. Este método fornece uma visão global dos processos que resultam de reação redox, que ocorrem em um eletrodo por efeito da polarização eletroquímica, entre dois valores de potenciais (E_i e E_f), onde a varredura do potencial é realizada em uma velocidade constante. A resposta da medida corresponde ao registro da intensidade da corrente (I) *versus* potencial aplicado (E) (FONSECA, PROENÇA e CAPELO, 2015).

Nas técnicas voltamétricas é necessária à utilização da célula eletroquímica onde acontece o processo de eletrólise. Esta célula é composta pelo eletrólito suporte, eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e contra eletrodo.

Um voltamograma cíclico típico envolve a variação do potencial do eletrodo de trabalho com o tempo. A corrente no eletrodo de trabalho é registrada em função do potencial (E) aplicado. Em voltametria cíclica, a corrente medida é a soma da corrente faradaica e a corrente capacitiva (AMIN et al., 2018).

Segundo Pacheco et al. (2013), as informações sobre o analito são obtidas quando é aplicado um potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência. O sinal eletroanalítico é decorrente da medição da magnitude da corrente elétrica que surge somente entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo, a qual é possível pelo uso de

potenciostatos que garantem que nenhuma corrente elétrica circule para o eletrodo de referência.

A resposta da corrente é registrada em função de uma programação de potencial ao longo do tempo na forma de uma onda triangular conforme (FIGURA 3), que produz a varredura no sentido direto e depois no inverso. Um experimento envolvendo VC pode ser empregado em um ciclo inteiro, parcial ou em vários ciclos (SKOOG et al., 2006).

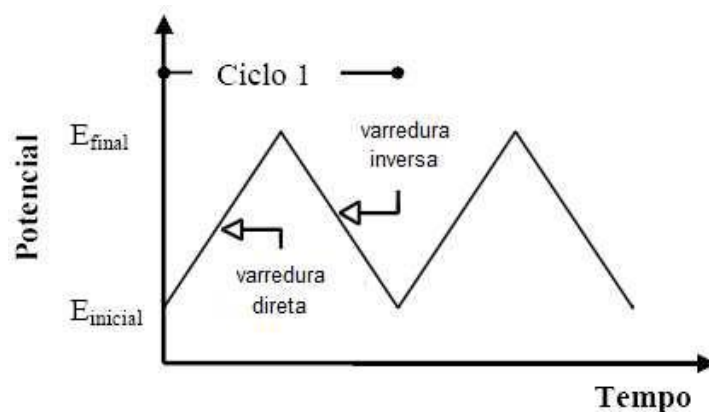


FIGURA 3: Voltametria cíclica: variação de potencial com o tempo na forma de uma onda triangular. Fonte: SOUZA, 2011.

De acordo com Amin et al. (2018), a voltametria cíclica é a técnica mais frequentemente usada em química eletroanalítica. Por meio dela é possível obter uma riqueza de recursos analíticos. Nesta mesma vertente, Wang (2000) afirma a importância da VC para aquisição de informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos, tornando-se uma técnica eficiente em fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos. A FIGURA 4 mostra uma representação esquemática de um VC típico para processos reversíveis.

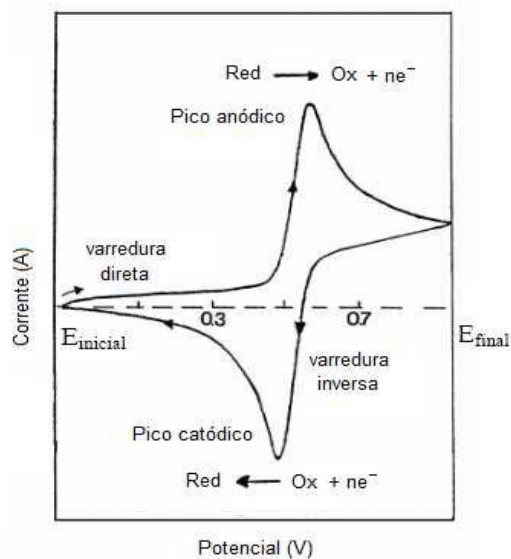


FIGURA 4: Voltamograma cíclico para uma reação reversa. Fonte: SOUZA, 2011.

De acordo com o VC da FIGURA 4, à medida que o potencial é varrido no sentido anódico, a reação de oxidação das espécies eletroativas presentes em solução passa a ocorrer, gerando uma corrente de pico anódica (I_{p_a}). Continuando a varredura, a corrente começa a diminuir em função de limitações por transporte de massa, ou seja, o processo é totalmente controlado por difusão (WANG, 2000). Quando a varredura de potencial é invertida ocorre o processo de redução das espécies eletroativas, seguindo perfil de corrente registrada semelhante ao anteriormente descrito. No caso de processos reversíveis, a reação é suficientemente rápida para manter as concentrações dos reagentes e produtos em equilíbrio na superfície do eletrodo. Assim, os produtos que foram gerados no sentido de varredura direta (oxidação) são reduzidos na varredura inversa, gerando assim um pico catódico simétrico ao pico anódico. A intensidade de corrente é proporcional à concentração adicionada do analito (SOUZA, 2011).

Pela voltametria cíclica é possível verificar a reversibilidade do processo redox. Testes diagnósticos são realizados baseados na dependência das correntes de pico e do potencial de pico em função da variação da velocidade de varredura. Esses parâmetros permitem obter informações sobre os processos ocorridos, podendo ser classificados como reversíveis, quase reversíveis e irreversíveis (RIBEIRO, 2012).

1.4.2 VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL

Segundo Wang (2000), as técnicas de pulso foram desenvolvidas por Barker e Jenkin com a intenção de reduzir os limites de detecção das medidas voltamétricas. A técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD) é considerada uma técnica sensível em razão da corrente capacitiva poder ser descontada nesta análise. Geralmente, os limites de detecção com a VPD são duas ou três ordens de grandeza menores que aqueles obtidos com a voltametria cíclica (SKOOG et al., 2006). Duas componentes constituem a corrente total: a corrente faradáica, relativa à reação de oxirredução da espécie em estudo no eletrodo de trabalho e a corrente capacitiva, que é a corrente necessária para carregar a dupla camada elétrica existente na interface eletrodo/solução (PACHECO et al., 2013).

Nas técnicas de pulso é utilizada a medida da corrente elétrica em função do tempo de aplicação de um determinado pulso de potencial. A forma que o pulso de potencial é aplicado é que define e diferencia as técnicas de pulso. As magnitudes das correntes registradas estão relacionadas tanto com a amplitude do pulso como com a escada de potencial (ou velocidade de varredura) que é aplicada no eletrodo para promover o processo faradaico (SOUZA, MACHADO & AVACA, 2013).

Na voltametria de pulso diferencial, pulsos de igual amplitude são aplicados (e sobrepostos) sobre uma rampa linear de potencial. A corrente é medida antes de o pulso ser aplicado (FIGURA 5a, S1) e no final do pulso (FIGURA 5a, S2). A primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda e a diferença das correntes é graficadas em função do potencial da rampa linear, gerando um voltamograma de pulso diferencial, com a forma de uma curva gaussiana (FIGURA 5b). Nesta técnica, a corrente de pico (i_p) é diretamente proporcional à concentração da espécie investigada (PACHECO et al., 2013).

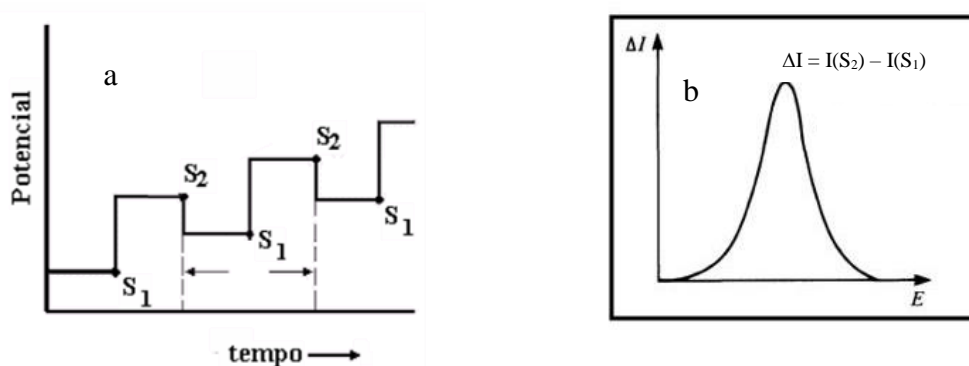


FIGURA 5: a) Programação da aplicação de pulso na VPD e b) Representação esquemática de um voltamograma de VPD típico.

1.5 ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO (DDB)

Em 1925, Heyrovsky iniciou o trabalho para desenvolver o eletrodo de mercúrio para detecção eletroquímica. De seus estudos, surgiu a polarografia de corrente direta, que recebeu o Prêmio Nobel de Química em 1950. Entre as inúmeras vantagens da utilização do eletrodo de mercúrio se encontra a detecção de agrotóxicos em diferentes matrizes. No entanto, esse material de eletrodo é limitado para o intervalo de potenciais positivos, além de ser um metal de elevada toxicidade (GALLI et al., 2006).

Nas últimas décadas, o avanço da tecnologia propiciou o aperfeiçoamento das técnicas eletroquímicas, em destaque para variedade de materiais de eletrodo e suas inúmeras possibilidades de modificação da superfície com intenção de melhorar a sensibilidade do método.

O diamante puro possui características isolantes, o que o impede de ser utilizado como material de eletrodo. Como solução, a dopagem de eletrodos de diamante com algum materiais condutores (BARROS et al., 2005) tornaram seu uso possível dentro da área de eletroquímica/electroanalítica. Entre os eletrodos desenvolvidos, destaca-se o eletrodo de diamante dopado com boro (DDB).

Os eletrodos de DDB têm sido utilizados como um material inovador, especialmente por sua estabilidade e sensibilidade em detecções eletroquímicas. Seu uso em aplicações eletroquímicas deve-se, essencialmente, às excelentes propriedades físico-químicas apresentadas por este material (BELGHITI et al., 2016). O eletrodo de DDB se

destaca de outras formas de carbono que são normalmente usadas como material de eletrodo, tais como, pasta de carbono, grafite pirolítico e carbono vítreo. Essas propriedades são (a) larga janela de potencial em meios aquosos e não aquosos; (b) baixa e estável corrente de fundo; (c) boa resposta, com pré-tratamento convencional a alguns analitos aquosos e não-aquosos; (d) estabilidade na resposta em longo prazo (por exemplo, exposição ao ar durante meses); (e) extraordinária estabilidade morfológica e micro-estrutural a altas temperaturas (por exemplo, 180 °C) e densidades de corrente (por exemplo, 0,1-10 A/cm², 85% v/v H₃PO₄); (f) fraca adsorção de moléculas polares, o que melhora a resistência do eletrodo à desativação ou envenenamento (HUPERT et al., 2003; ANDRADE et al., 2009; YANG, FOORD e JIANG, 2016).

O eletrodo de DDB pode ter sua superfície modificada por meio de pré-tratamentos de acordo com o interesse da análise. A polarização do eletrodo de DDB provoca uma modificação na sua superfície de tal forma que, quando ele é submetido a um pré-tratamento anódico sua terminação superficial é preferencialmente de oxigênio, e quando é aplicado um pré-tratamento catódico sua superfície fica com uma terminação preferencial de hidrogênio (CARVALHO, 2007). Assim, o pré-tratamento eletroquímico (inicialmente anódico, seguido pelo pré-tratamento catódico) pode ser considerado uma etapa simples e rápida, capaz de melhorar a transferência de carga sobre a superfície do eletrodo de trabalho. O efeito do pré-tratamento aplicado na superfície do eletrodo de DDB proporciona um aumento do sinal de corrente quando comparado a uma análise feita com o mesmo eletrodo sem realização do pré-tratamento (RIBEIRO et al., 2018; DE AMORIM et al., 2017; ANDRADE et al., 2009).

1.6 CLAE/EC

Métodos eletroquímicos têm sido empregados para a determinação de compostos ativos farmacêuticos em níveis traço, em estudos de monitoramento de produtos ambientais, industriais e biológicos com sensibilidade, precisão e exatidão adequadas. As modernas técnicas eletroanalíticas são aplicáveis na quantificação de hormônios e agroquímicos, com algumas vantagens em relação a outras metodologias, pois produzem medidas rápidas e confiáveis do analito, consumindo pequenas quantidades de reagentes (ASSIS et al., 2014; MIRANDA et al., 2015).

Alguns métodos importantes em análises eletroquímicas são aqueles que medem a corrente enquanto se controla o potencial. Entre as técnicas desse grupo estão a voltametria e a amperometria. A amperometria mede a corrente (resultado da oxidação ou redução do analito), quando o eletrodo de trabalho é mantido em potencial (E) fixo. Esse tipo de detecção é o mais utilizado em detectores eletroquímicos em fluxo (HAGE e CARR, 2012).

Adams e seu grupo de pesquisa (KISSINGER, et al., 1973) foram os pioneiros no desenvolvimento da detecção eletroquímica associada à cromatografia líquida. Assim, o acoplamento das duas técnicas tornou a análise uma ferramenta poderosa para a química analítica (MAHÉ, DEVILLIERS e DARDOIZE, 2015).

Na técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Eletroquímica (CLAE/EC) a amostra passa pela coluna cromatográfica, onde ocorre a separação dos analitos de interesse de acordo com a fase móvel escolhida, e é detectada por um sensor eletroquímico que irá gerar o sinal de corrente registrado em um cronoamperograma.

Dentre os detectores eletroquímicos, o amperométrico se destaca, pois é considerado mais seletivo devido ao fato de somente compostos eletroativos no potencial aplicado serem detectados. Além disso, a amperometria é uma técnica considerada de configuração simples, que tem boa relação sinal/ruído, elevada sensibilidade para muitas espécies eletroativas, o que permite o emprego de pequenas quantidades de amostra (DOS SANTOS et al., 2009; SEDENHO, 2016).

Esses detectores são compostos por um potenciostato e um sensor: uma célula de fluxo composta por três eletrodos (trabalho, referência e contra eletrodo), que é a parte sensível do detector. O princípio dos detectores amperométricos baseia-se na aplicação de um potencial elétrico adequado entre o eletrodo de referência e o eletrodo de trabalho e no registro da corrente faradaica resultante da reação do analito no eletrodo de trabalho, a qual é proporcional à concentração da amostra (MAHÉ, DEVILLIERS e DARDOIZE, 2015).

Quando se trabalha com amostras de composição química complexa como as de alimentos, ambientais e clínicas, normalmente é necessário determinar compostos orgânicos em baixas concentrações, ou em nível traços. A detecção eletroquímica combinada à cromatografia líquida pode, portanto, constituir-se uma ferramenta analítica potencialmente útil e eficiente (DOS SANTOS et al., 2009).

Mediante ao exposto, a CLAE/EC constitui uma técnica inovadora para detecção do fungicida TBZ em amostras de tomate. Até onde foi possível verificar, a literatura pertinente não aponta nenhum trabalho relacionado ao uso de CLAE/EC para determinação de TBZ em tomate ou em qualquer outra matriz. Entretanto, existem alguns trabalhos relacionados ao estudo desse agrotóxico por detecção eletroquímica além de outros relacionados à determinação de TBZ utilizando diferentes técnicas de detecção, os quais estão descritos a seguir.

Li et al. (2019) criaram um sensor de polímero impresso molecularmente (MIP) a partir da fabricação de uma membrana na superfície do eletrodo modificado com óxido de grafeno (ERGO) eletroquimicamente reduzido, para detecção TBZ. O sensor foi caracterizado pelas técnicas de VC, VPD, espectroscopia de impedância eletroquímica, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de infravermelho. Esse sensor foi utilizado para detectar TBZ nas concentrações $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ em amostras de suco de laranja e atingiu valores de recuperação que variaram de 96,3% para 104,9% com desvio padrão relativo (DPR) médio de 4,9%.

Dong, Yang e Zhang (2017) desenvolveram um material nanohíbrido de $\text{ZnFe}_2\text{O}_4/\text{SWCNTs}$ o qual foi sintetizado como material de eletrodo e aplicado à determinação simultânea de TBZ e carbendazim (CBZ). O comportamento eletroquímico dos fungicidas foi investigado usando VC e VPD. Os resultados mostraram limites de detecção de $0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,09 \mu\text{mol L}^{-1}$, para TBZ e CBZ, respectivamente. O intervalo de concentração para a determinação simultânea de TBZ e CBZ foi de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Yang et al. (2015) desenvolveram um método simples e sensível para detectar TBZ. Utilizaram as técnicas de VC e VPD e como eletrodo de trabalho usaram nanotubos de carbono vítreo modificado (MWCNT-COOH/GCE) em tampão fosfato solução (pH = 6,0). Os resultados mostraram que o método exibiu duas faixas lineares de concentração de TBZ variando de $5,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a $4,95 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $4,95 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $9,80 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. O limite de detecção foi de $3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e DPR inferior a 4,2%.

Wu e colaboradores (2009) desenvolveram um método para determinar TBZ e Carbendazim (CBZ) em amostras de água e solo utilizando micro extração líquido-líquido

dispersiva (DLLME) com análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. Como resultados obtiveram recuperações de 50,8% e 70,9% para TBZ e CBZ, respectivamente. A linearidade do método foi obtida no intervalo de 5 ng mL⁻¹ a 800 ng mL⁻¹ para análise de amostras de água e 10 ng g⁻¹ a 1000 ng g⁻¹ para amostras de solo. Os coeficientes de correlação (r) variaram de 0,9987 a 0,9997. Os limites de detecção foram de 0,5-1,0 ng mL⁻¹ para amostras de água e 1,0-1,6 ng g⁻¹ para amostras de solo. Os desvios padrão relativos variaram entre 3,5% a 6,8%.

Moral et al. (2009) propuseram um método de microextração em uma única etapa sem necessidade de limpeza ou concentração dos fungicidas TBZ, CBZ e fuberidazol (FBZ), utilizando um solvente supramolecular constituído por micelas (SUSME). Os analitos foram determinados no extrato supramolecular por cromatografia líquida (LC) com detecção por fluorescência. Limites de quantificação para o TBZ, CBZ e FBZ em frutas e legumes de 1,3 µg kg⁻¹, 14 µg kg⁻¹ e 0,03 µg kg⁻¹ foram obtidos, respectivamente. A precisão do método, expresso como desvio padrão relativo, foi de 3,5% para TBZ, 3,3% para CBZ e 2,8% para FBZ e recuperações para frutas fortificadas ao nível de µg kg⁻¹ foram de 93% a 102%.

Blazková et al. (2010) relataram o desenvolvimento de um teste de imunoenensaio para detecção do TBZ baseado no princípio competitivo indireto usando partículas de carbono como substrato. A linearidade do método foi obtida em um intervalo de 0,11 ng mL⁻¹ a 4,13 ng mL⁻¹. Esta técnica foi aplicada na análise de sucos de frutas de laranja, maçã, banana e pera, obtendo-se limites de detecção para cada uma dessas matrizes de 0,10 ng mL⁻¹, 0,09 ng mL⁻¹, 0,07 ng mL⁻¹ e 0,07 ng mL⁻¹, respectivamente. As recuperações dos sucos foram de 81,9% a 123,6% e os desvios padrões relativos variaram de 9,9% a 19,3%.

Luo et al. (2016) aplicaram a técnica de Espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS) acoplada a nanopartículas de ouro para análise de TBZ e fosmete (FMT) em maçãs. A concentração mínima detectável foi de 0,1 µg g⁻¹ para TBZ e 0,5 µg g⁻¹ para FMT. Os coeficientes de correção linear (r²) obtidos foram de 0,959 para TBZ e 0,936 para o FMT.

Díaz-Alvarez & Martín-Esteban (2018) desenvolveram microesferas de polímeros molecularmente impressas (MIP) com fibra oca de polipropileno (HF) para microextração em fase sólida de TBZ em casca de laranja e limão. Para esta determinação foi utilizada a

técnica de CLAE acoplada a um detector do tipo UV com arranjo de diodos. Os resultados obtidos mostraram limite de detecção de $0,004 \text{ mg kg}^{-1}$ em laranja e $0,009 \text{ mg kg}^{-1}$ em limão, sendo a recuperação variada de 5,1% a 6,1%, com desvio padrão relativo inferior a 4,0%.

Feng et al. (2018) desenvolveram um quimiosensor de polímeros molecularmente impressos (MIPs) para determinação de tiabendazol em suco de laranja. Como resultado encontram coeficiente de correção linear (r^2) de 0,99 e limite de detecção de 4 mg L^{-1} e de quantificação 13 mg L^{-1} .

Alsammarraiea et al. (2018) desenvolveram um método de Espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS) em combinação com novos substratos baseados em nanomateriais de ouro (AuNRs) para medição e quantificação rápida do agrotóxico TBZ extraído em amostra de sucos de limão, cenoura e manga. Como resultado, os autores obtiveram coeficientes de correção linear (r^2) de 0,99, 0,98 e 0,99 e limites de detecção de $149 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $216 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e $179 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ seguindo a ordem de matrizes anteriormente citada.

Fu et al. (2019) utilizaram espectroscopia Espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS) combinada com um substrato de matriz de nanobastões de ouro reutilizáveis (GNR) para detectar tiabendazol em amostras de maçãs. Nas condições ótimas do método, foi obtido limite de detecção de 0,06 ppm e limite de quantificação de 0,980 ppm, com recuperação de 76% a 107%.

Díaz-Alvarez et al. (2019) desenvolveram uma barra de agitação molecularmente impressa (SBSE) para extração por sorção de TBZ e CBZ em amostras de laranja com detecção por CLAE-UV com arranjo de diodo. Os limites de detecção encontrados foram $0,10 \text{ mg kg}^{-1}$ para o TBZ e $0,13 \text{ mg kg}^{-1}$ para o CBZ. Os limites de quantificação determinados foram de $0,30 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,40 \text{ mg kg}^{-1}$ para o TBZ CBZ, respectivamente.

1.7 EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM

A extração por ponto nuvem, do inglês “Cloud point extraction” (CPF), vem despertando maior interesse nos últimos anos por ser uma técnica promissora de separação e pré-concentração do analito, comparada a extração líquido-líquido convencional. A extração por ponto nuvem (EPN), introduzida pela primeira vez no ano de 1978 por

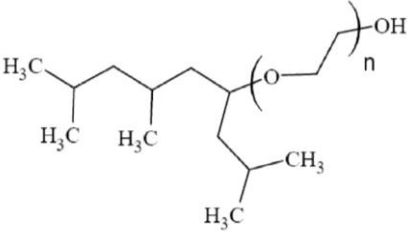
Watanabe e Tanaka, é uma alternativa eficiente, pois é capaz de fornecer altos valores de fator de pré-concentração, simplicidade de operação, além de permitir o uso de soluções diluídas de surfactantes como meio extrator, contribuindo para uma pequena geração de resíduos de laboratório. Os surfactantes utilizados na técnica de EPN são considerados pouco inflamáveis e de baixa toxicidade para o analista e para o meio ambiente. Essa técnica é considerada mais vantajosa em comparação com a extração líquido-líquido convencional, a qual demanda quantidade excessiva de solventes orgânicos (WANG et al., 2016; COSTA, 2013 e RESENDE, 2010).

O estudo de matrizes orgânicas é complexo, uma vez que gera dificuldades decorrentes dos interferentes da matriz, muitas vezes prejudicando a sensibilidade do método. Assim, a determinação direta de analitos torna-se dificultada sem a realização de processos de separação e pré-concentração. Como uma alternativa, a EPN é considerada uma técnica “limpa” porque segue os princípios da “Química Verde” (LENARDÃO et al., 2003), já que tem como vantagens a simplicidade, uso de menor quantidade de amostra, baixo custo, utiliza reagentes com menor ou nenhuma toxicidade, quantidade reduzida de solvente orgânico (POURREZA, SHARIFI e GOLMOHAMMADI, 2016).

Nesta técnica são utilizadas substâncias surfactantes (tensoativos) que têm a capacidade de modificar algumas propriedades reacionais com objetivo de melhorar a sensibilidade e/ou seletividade do método analítico. Sua principal característica é a formação de ambientes micelares. Micelas são estruturas supramoleculares que possuem regiões estruturais hidrofílicas e hidrofóbicas, que dinamicamente se associam espontaneamente em solução aquosa a partir de certa concentração micelar, conhecida como concentração micelar crítica (CMC), formando grandes agregados moleculares de dimensões coloidais. Abaixo da CMC, o surfactante está predominantemente na forma de monômeros não associados. As micelas são termodinamicamente estáveis, facilmente reprodutíveis e são destruídas pela diluição com água, quando a concentração do tensoativo ficar abaixo da CMC. Porém, quando a CMC é ultrapassada, o processo de formação de agregados micelares é favorecido, dentro de uma dinâmica de equilíbrio com seus próprios monômeros, indicando que as micelas não são estruturas estáticas (MANIASSO, 2001; ROCHA, 2013). A FIGURA 6 mostra uma representação esquemática da formação das micelas.

Neste trabalho, a realização do procedimento de EPN será feita utilizando o surfactante não iônico Tergitol TMN-6. O surfactante é uma substância orgânica anfipática que possui uma longa cadeia hidrofóbica e um pequeno grupo carregado ou polar hidrofílico. Nos surfactantes derivados de alcoóis secundários de alquilpolioxietileno, a parte hidrofóbica é formada por grupos alquila e a parte hidrofílica por cadeias de moléculas de oxietileno (EO) (WANG & DAI, 2010; DE AMORIM, 2015). A TABELA 4 mostra a estrutura do Tergitol TMN-6, número de unidades de oxietileno (EO), balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) e a correspondente temperatura de ponto nuvem (TPN).

TABELA 4: Parâmetros do surfactante Tergitol TMN-6.

Estrutura química	Média de unidades de EO	HLB	TPN (°C)	CMC (mmol L ⁻¹)
	6	13,1	36	0,16

Fonte: Adaptado de WANG & DAI, 2010 e DE AMORIN, 2015.

A EPN é considerada uma técnica atrativa para análise de agrotóxicos, pois normalmente estas substâncias estão presentes em níveis traço em amostras reais (FARIA et al., 2005). Assim, esta técnica auxilia no preparo das amostras (pré-concentração) e contribui para práticas mais sustentáveis tal como descrito anteriormente.

Para que a técnica de EPN seja utilizada de forma eficiente, é necessário encontrar as melhores condições de trabalho relacionadas às variáveis envolvidas no processo, tais como concentração do surfactante empregado, quantidade de sal adicionada, temperatura das alíquotas no ponto nuvem e tempo de agitação ultrassônica.

Até onde foi possível verificar, assim como no caso de trabalhos envolvendo detecção eletroquímica de TBZ, poucos trabalhos relacionados a estudos de EPN para determinação de TBZ, têm sido encontrados. Assim, encontram-se descritos abaixo os

trabalhos que empregaram EPN para extrair/pré-concentrar TBZ juntamente com outros agrotóxicos em diferentes matrizes e também aqueles relacionados à extração de outros fungicidas também por ponto nuvem.

Santaladchaiyakit & Srijaranai (2012) criaram um método simples de extração por ponto de nuvem usando surfactante Triton X-114 assistida por ultrassom combinado com detecção por CLAE-UV para detectar TBZ, oxfendazol, mebendazol, albendazol e fenbendazol em amostras de água e leite. Sob condições otimizadas de EPN, foi obtido linearidade na faixa de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ a 100 mg L^{-1} com coeficiente de correlação (r^2) superior a 0,996. Os limites de detecção variaram no intervalo de $0,005 \text{ mg L}^{-1}$ a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ e as recuperações variaram entre 81,6% a 111,4% (em matriz de água) e 75,3% a 111,4% (em matriz de leite).

No estudo realizado por Stangl & Niessner (1994), o surfactante Genapol X-80 foi utilizado para extrair napropamida e TBZ de água e solo. Limites de detecção abaixo de $0,2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e taxa de recuperação de até 95% foram relatados pelos autores pelo uso da técnica de detecção por fluorescência.

Halko et al. (2004) desenvolveram um método de EPN para determinar fungicidas e seus resíduos (benomil, CBZ, TBZ e fuberidazol) em amostras de água utilizando os surfactantes Genapol X-80 e POLE. As análises foram realizadas por CLAE com detecção por fluorescência. As recuperação variaram entre 68% e 96% para ambos surfactantes e os limites de detecção obtidos pelo uso dos dois surfactantes foram de $6,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $7,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $0,15 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ $0,01 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para CBZ, benomil, TBZ e fuberidazol, respectivamente.

Martines et al. (1996) utilizaram a técnica de EPN para extração e pré-concentração dos fungicidas Folpet, Captan e Captafol em água de rio, empregando o surfactante Triton X-114. Utilizaram CLAE acoplada a um detector eletroquímico com um eletrodo duplo de carbono vítreo. Os limites de detecção obtidos foram de aproximadamente $4,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e os desvios padrão relativos foram inferiores a 10%.

No trabalho de Jia et al. (2008), foi desenvolvido um procedimento para determinação de cinco organofosforados em matriz de urina humana utilizando EPN acoplada a micro-ondas. O surfactante não iônico usado foi Triton X-114. A detecção foi feita por cromatografia gasosa com detecção de fotometria de chama (GC-FPD) e os limites

de detecção foram na faixa de $0,04 \text{ ng mL}^{-1}$ a $0,08 \text{ ng mL}^{-1}$ e os desvios padrões relativos foram inferiores a 9%.

Sohrabi et al. (2012) desenvolveram um método para extração e determinação do organofosforado diazinon por EPN e detecção por espectrofotometria UV. Os autores usaram o surfactante catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e o limite de detecção obtido foi de $0,02 \text{ ng mL}^{-1}$ com desvio padrão foi de 0,76%.

Liu et al. (2014) utilizaram EPN e CLAE-UV para detecção de quatro tipos de triazinas (herbicidas) em matriz de leite. O surfactante usado foi Triton X-100 e os limites de detecção e recuperação obtidos foram de $6,79 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ a $11,19 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e 70,5% a 96,9%, respectivamente.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um procedimento para determinação eletroanalítica do fungicida TBZ em frutos de tomate usando eletrodo de DDB a partir da extração e pré-concentração pelo uso da técnica de ponto nuvem utilizando o surfactante não iônico Tergitol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterização eletroquímica do TBZ sobre eletrodo de DDB;
- ✓ Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para a determinação de TBZ em matriz de tomate sobre eletrodo de DDB;
- ✓ Otimização de parâmetros experimentais nas etapas de extração e pré-concentração por ponto nuvem, e avaliação da eficiência de extração utilizando o surfactante não iônico Tergitol TMN-6;
- ✓ Validação de metodologia analítica para a determinação e quantificação do agrotóxico TBZ em matriz de tomate, sob condições eletroquímicas otimizadas por CLAE/EC e VPD.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS E REAGENTES

Para o preparo do eletrólito suporte de tampão fosfato com concentração $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ realizou-se a dissolução do Fosfato de Potássio Monobásico Anidro P.A (Synth) em água deionizada (Milli-Q). Para o ajuste do pH das soluções foi utilizado Hidróxido de Sódio P.A (Synth) e Ácido o-Fosfórico (Synth) na concentração de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Para a realização do pré-tratamento do eletrodo DDB foi utilizada solução de H_2SO_4 (Synth) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução estoque do fungicida TBZ (Sigma-Aldrich) foi preparada na concentração de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em Acetonitrila (J.T. Baker) grau HPLC. A solução foi mantida ao abrigo da luz e sob refrigeração.

As soluções de surfactante Tergitol TMN-6 (Sigma-Aldrich) foram preparadas adicionando quantidades adequadas de surfactante e água deionizada de tal forma a obter concentrações de 10%, 20% e 30% (em proporções V/V).

As amostras de tomates foram plantadas e cultivadas pela autora da dissertação sem a utilização de qualquer tipo de agrotóxico, garantindo a procedência 100% orgânica do material (na agricultura orgânica não é permitido o uso de substâncias que coloquem em risco a saúde humana e o meio ambiente). Após a colheita, os frutos foram mantidos congelados até a utilização.

3.2 MATRIZ ORGÂNICA: PLANTAÇÃO E CULTIVO DO TOMATE

O estudo foi realizado na matriz tomate tipo cereja - *Solanum lycopersicum var. cerasiforme*. As mudas foram adquiridas de um produtor rural da região de Lagamar-MG, Noroeste do estado de Minas Gerais, que mantém o plantio de hortaliças e vegetais orgânicos, as quais foram plantadas na mesma cidade.

Tanto a plantação como o cultivo dos tomates foram realizadas de “forma orgânica”, com ausência de qualquer tipo de agrotóxico com intuito de garantir a procedência do material escolhido como matriz para pesquisa (FIGURA 8).



FIGURA 8: Fotos do cultivo e colheita da matriz orgânica (tomate). Fonte: Autora.

3.3 MATERIAIS E INSTRUMENTOS PARA MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

3.3.1 SISTEMA ELETROQUÍMICO

As análises eletroquímicas realizadas neste trabalho foram feitas em modo batelada (VC e VPD) e em fluxo (CLAE/EC), utilizando célula eletroquímica do tipo convencional (três eletrodos) e um Potenciostato/Galvanostato modelo PGSTAT 128N da AUTOLAB acoplado a um computador com *software* GPES versão 4.9. Os dados obtidos foram processados por meio do programa *Origin* 6.0 que gerou as figuras dos voltamogramas apresentadas no decorrer do trabalho.

Para o pré-tratamento do eletrodo de DDB utilizou-se célula eletroquímica convencional em vidro com capacidade de 40 mL, com tampa em Teflon e orifícios para posicionamento dos eletrodos e para adição de alíquotas do analito.

O eletrodo de trabalho (ET) utilizado foi o DDB com área igual a $1,2 \text{ cm}^2$, o qual foi introduzido em um suporte de Teflon permitindo uma área exposta de $0,32 \text{ cm}^2$ (FIGURA 9). Como contra eletrodo (CE) utilizou-se uma placa de platina com área de $1,5 \text{ cm}^2$ embutida em tubo de vidro.

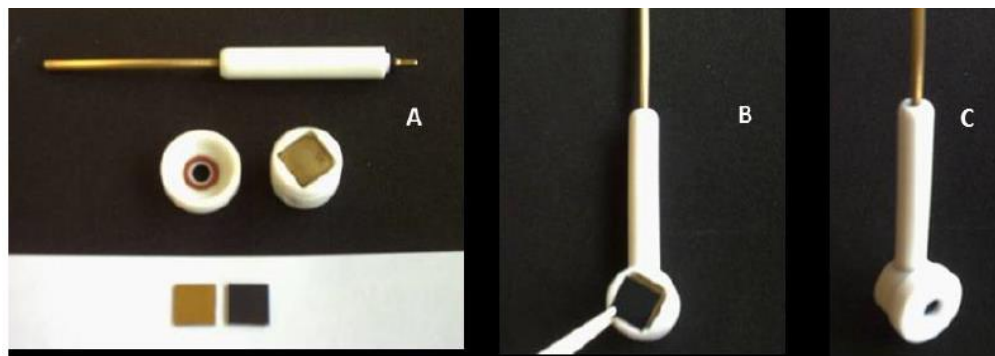


FIGURA 9: Suporte de teflon para o eletrodo de trabalho (DDB): (A) suporte aberto mostrando o compartimento onde o eletrodo de trabalho é colocado (B) eletrodo de DDB sendo colocado no suporte e (C) suporte fechado pronto para ser usado nas análises eletroquímicas. Fonte: DE AMORIM, 2015.

Por último, o eletrodo de Ag/AgCl em meio a KCl saturado foi utilizado como eletrodo de referência (ER). Para sua construção realizou-se eletrodeposição de um filme de cloreto de prata (AgCl) em um fio de Prata (Ag) utilizando solução saturada de KCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e aplicando-se uma corrente anódica de 100 mA por 30 s. Após este procedimento, o fio de Ag/AgCl foi colocado em um tubo de vidro contendo uma ponta de platina embutida na extremidade. Na FIGURA 10 encontra-se a fotografia da célula eletroquímica com três eletrodos utilizada neste trabalho.

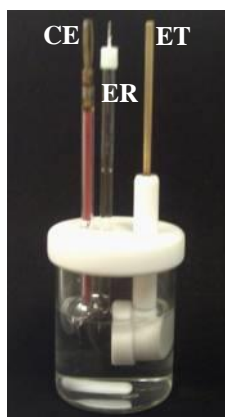


FIGURA 10: Fotografia da célula eletroquímica convencional de três eletrodos: contra eletrodo (CE), eletrodo de referência (ER) e eletrodo de trabalho (ET).

3.3.2 ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO (DDB)

O eletrodo de DDB utilizado neste trabalho foi produzido pelo Centro Suíço de Eletrônica e Microtécnica (CSEM), Neuchâtel, Suíça. O eletrodo foi preparado pela

deposição de um filme de DDB sobre um dos lados de uma placa de p-silício. Sobre o outro lado da placa de p-silício foi depositado um filme fino de ouro, para propiciar contato elétrico adequado.

O filme de DDB foi sintetizado pela técnica de deposição de vapor químico assistida por filamento quente HF-CVD (Hot Filament Chemical Vapor Deposition), com a temperatura do filamento compreendida entre 2440 °C e 2560 °C. A fase gasosa consistia dos gases metano e excesso de hidrogênio, sendo o gás de dopagem o trimetilboro. O teor nominal de dopagem do eletrodo utilizado foi de 8000 ppm de boro.

3.4 PRÉ-TRATAMENTO DO ELETRODO DE DDB

Antes do início das medidas eletroanalíticas, o eletrodo de DDB foi submetido à limpeza com água deionizada e condicionamento eletroquímico de sua superfície. O condicionamento do eletrodo de DDB envolveu pré-tratamento anódico com duração de 30 s seguido de pré-tratamento catódico por 150 s, ambos utilizando uma densidade de corrente de 1,0 A cm² em H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹. Uma placa de platina foi utilizada como contra-eletrodo e uma fonte de tensão/corrente (Instrutherm[®]) forneceu a corrente necessária em cada pré-tratamento.

3.5 COMPORTAMENTO DO TBZ SOBRE O ELETRODO DE DDB

O estudo do perfil e caracterização eletroquímica do TBZ foi realizado utilizando as técnicas de voltametria cíclica (VC) e de pulso diferencial (VPD), ambas em eletrólito suporte tampão fosfato (K₂PO₄) 0,01 mol L⁻¹.

As medidas voltamétricas foram realizadas em temperatura ambiente numa célula eletroquímica com capacidade para 40 mL (FIGURA 10) e em diferentes pH.

3.5.1 VOLTAMETRIA CÍCLICA

O perfil voltamétrico do TBZ foi estudado pela técnica de voltametria cíclica em uma faixa de pH 2 a 11.

Após a realização do pré-tratamento (Seção 3.4), o eletrodo de DDB foi submetido a 40 ciclos de voltametria cíclica em tampão fosfato para estabilização eletroquímica, no

intervalo de potencial de 0 a 2,0 V, com velocidade de varredura 250 mV s^{-1} . Em seguida, a VC foi realizada no intervalo de potencial de 0,9 V a 1,6 V x Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) com velocidade de varredura 100 mV s^{-1} gerando um voltamograma (branco).

Na mesma condição anteriormente descrita, realizou-se a VC da solução de TBZ com concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$) a qual foi obtida pela adição de 200 μL de solução padrão de TBZ ($2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) aos 40 mL de eletrólito suporte presentes na célula eletroquímica. O mesmo procedimento foi realizado para todos os pH investigados.

3.5.2 VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL

Com base nos resultados obtidos na VC, a análise do perfil voltamétrico do fungicida TBZ foi investigado por VPD, no intervalo de potencial de 0,75 V a 1,5 V x Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) em faixas de pH que variaram de 2 a 11.

Após definida a melhor condição de pH, os parâmetros de amplitude, escada de potencial e velocidade de varredura foram devidamente otimizados. Uma vez obtida as melhores condições de VPD, testes de repetitividade e de limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram realizados. O LD foi determinado pelo método visual por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até ser possível fazer distinção visual entre o sinal da menor concentração analítica (detectável) e o sinal gerado pelos ruídos. Geralmente, as proporções de sinal-ruído aceitas como estimativas do LD são de 3:1. O limite de quantificação (LQ) foi determinado pelo mesmo critério do LD, utilizando a estimativa de 10:1 de relação sinal-ruído (INMETRO, 2016). Para a obtenção da curva analítica foram realizadas adições da solução padrão do fungicida TBZ nas seguintes concentrações: $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, $3 \mu\text{mol L}^{-1}$, $4 \mu\text{mol L}^{-1}$, $8 \mu\text{mol L}^{-1}$, $12 \mu\text{mol L}^{-1}$, $16 \mu\text{mol L}^{-1}$, $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $24 \mu\text{mol L}^{-1}$. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e cada ponto da curva foi obtido pela média aritmética do sinal de corrente registrado de cada injeção.

3.6 EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM

A metodologia de EPN desenvolvida neste trabalho foi baseada em trabalho prévio (DE AMORIM & ANDRADE, 2017) de nosso grupo de pesquisa (LAPAM), com algumas adequações e/ou modificações as quais estão descritas a seguir.

Os tomates cultivados foram triturados utilizando um misturador comercial (Mixer PHILIPS WALITA) sem adição de água, até obter uma polpa homogênea. A polpa do tomate foi armazenada em recipiente de vidro e congelada para posterior uso.

Alíquotas de 10 g da polpa foram pesadas em balança analítica (Adventure AR2140 OHAUS CORPORATION) e transferidas para um tubo tipo falcon de capacidade de 50 mL, seguido da adição de 10 mL de água deionizada (FIGURA 11a). Em seguida, o tubo foi submetido à agitação tipo vórtex (IKA GENIUS) por 3 min para homogeneizar a solução e depois levado a centrífuga (QUIMIS) por 5 min a uma velocidade de rotação de 4000 rpm (FIGURA 11b). A alíquota do sobrenadante (FIGURA 11c) foi retirada e adicionada a uma proveta com 100 mL de capacidade e fortificada com 500 μL de solução padrão do TBZ ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em Acetonitrila).

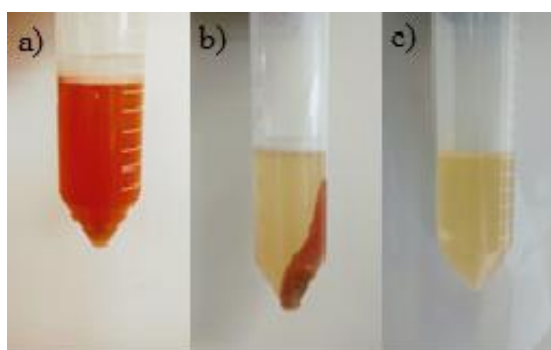


FIGURA 11: Fotos das etapas iniciais da EPN. a) Polpa do tomate com água; b) Amostra após 5 min na centrífuga; c) Alíquota do sobrenadante. Fonte: Autora.

Em seguida, o pH da solução sobrenadante foi ajustado e o volume da solução foi completado com água desionizada (Milli-Q - MILLIPORE, MERCK) até 100 mL. Desse volume, alíquotas de 10 mL foram transferidas para 10 tubos de vidro com tampa e fundo cônico seguido de adição de 500 μL de solução 10% (V/V) de Tergitol TMN-6 (em água) em cada um deles, e posterior agitação manual. As amostras foram então deixadas em um banho termostático (Elmasonic E30H 220 V ELMA) a 40 °C por 45 min, ao mesmo tempo em que eram submetidas a uma agitação ultrassônica com frequência de 20 kHz (FIGURA 12a). Após este procedimento, quantidades de 0,6 g de NaCl foram adicionadas e solubilizadas em cada um dos tubos contendo a amostra (FIGURA 12b).

Ao final, as alíquotas foram centrifugadas a uma velocidade de rotação de 4000 rpm por 5 min. Essa etapa, adicional ao processo, é utilizada para acelerar o processo de

separação das duas fases. Após centrifugação, as amostras separaram-se em duas fases, onde na parte superior do tubo encontra-se a fase rica em surfactante (FIGURA 12c), da qual eram retirados 100 μ L do sobrenadante com auxílio de uma micropipeta e então transferidos para vials, acrescidos de 100 μ L da fase móvel em estudo e deixados em banho ultrassônico por 2 min para homogeneização. Após este procedimento, as amostras eram injetadas no sistema CLAE e detectadas simultaneamente por UV e EC.



FIGURA 12: Fotos da EPN. a) Amostras no banho termostático; b) Após adição de 0,6 g de NaCl e c) Amostras após separação de fases. Fonte: Autora.

3.6.1 FATOR DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO

A EPN tem a capacidade de extrair e pré-concentrar o analito. Assim, para dimensionar o quanto da amostra pode ser pré-concentrada, utiliza-se o fator de pré-concentração (F_C). O F_C é obtido a partir da construção de duas curvas analíticas, sendo uma com procedimento de extração e outra sem o procedimento de extração. A razão entre os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas com e sem o procedimento de extração (Equação 1) é o que define o F_C (ESCALEIRA, 2005; COSTA, 2013 e DE AMORIM, 2015).

$$F_C = b_1/b_2 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde, F_C é o fator de pré-concentração, Ca_1 é o coeficiente angular da curva analítica com extração e Ca_2 é o coeficiente angular da curva analítica sem extração.

É importante ressaltar que a concentração do TBZ adicionada à alíquota no sobrenadante do tomate antes da extração e pré-concentração por ponto nuvem (C_{ad}) não é necessariamente igual a concentração obtida (C_{ob}), pois seu valor irá depender da eficiência

da extração. Ou seja, C_{ob} será diretamente dependente da eficiência dos processos de extração e pré-concentração em ponto nuvem, os quais levam em conta o fator de pré-concentração. Desta forma, C_{ob} pode ser obtida de acordo com a Equação 2.

$$C_{ob} = C_C/F_C \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde C_{ob} é a concentração obtida, C_C é a concentração do analito determinada pela curva analítica obtida sem qualquer processo de extração, e F_C é o fator de pré-concentração.

3.6.2 VARIAÇÃO DO pH DO TOMATE

O estudo do pH do sobrenadante do tomate foi realizado com a intenção de verificar se haveria modificação na eficiência do processo de extração e de pré-concentração em ponto nuvem. O resultado foi verificado considerando-se a magnitude no sinal analítico do TBZ obtido após análise por CLAE/EC.

Assim, antes da realização do processo de EPN, o sobrenadante da polpa de tomate teve seu pH ajustado entre 3 e 8, utilizando NaOH ou HCl 0,5 mol L⁻¹. Em seguida, procedeu-se a EPN e, por fim, as alíquotas foram injetadas no sistema CLAE/EC a fim de comparar os cromatogramas com detecção eletroquímica resultantes.

3.6.3 PLANEJAMENTO FATORIAL

Planejamentos fatoriais são frequentemente empregados para sistemas onde existem diversas variáveis ou fatores que podem influenciar na resposta de uma determinada medida. Assim, a realização de um planejamento fatorial torna possível a determinação das melhores condições das variáveis experimentais envolvidas em um processo a partir das interações observadas entre elas e que têm influência significativa sobre o registro da resposta (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2010).

Nesse sentido, com a intenção de avaliar e otimizar as principais variáveis envolvidas no processo de EPN, utilizou-se um planejamento fatorial 2⁴ completo. O programa utilizado para analisar os resultados foi o Statistica[®]. As variáveis consideradas neste planejamento foram concentração de Tergitol TMN-6 (% V/V), quantidade de NaCl adicionada (g), temperatura das alíquotas no ponto nuvem (°C) e tempo de agitação ultrassônica (min).

3.6.4 PLANEJAMENTO DE COMPOSTO CENTRAL

O planejamento de composto central é utilizado para verificar a curvatura de um plano (CALADO e MONTGOMERY, 2003). Esse tipo de planejamento consiste de uma parte referente ao planejamento fatorial 2^4 , onde é estudada somente a relação entre as variáveis significativas para o modelo matemático proposto, com a finalidade de encontrar os valores de máximo da curvatura da superfície de resposta, de onde se obtém os valores otimizados do sinal analítico.

3.7 CLAE/EC

3.7.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Para a realização das análises por CLAE/EC, acoplou-se ao sistema cromatográfico (FIGURA 13) um detector eletroquímico especialmente projetado e confeccionado para este fim (FIGURA 14). O sensor eletroquímico era controlado de forma paralela e independente por um potenciostato (PGSTAT 128N) e sua entrada era conectada diretamente à linha de saída do detector do cromatógrafo. Dessa forma, os cromatogramas com detecção UV e com detecção eletroquímica das amostras extraídas por ponto nuvem foram obtidos simultaneamente, mas não de forma sincronizada, dado que são resultados obtidos de equipamentos distintos.

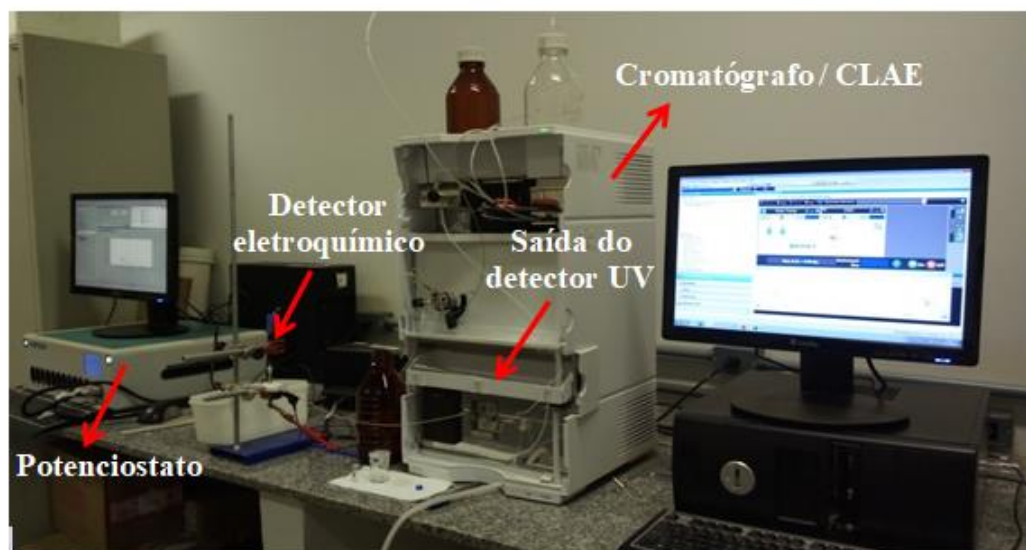


FIGURA 13: Foto do sistema acoplado CLAE/EC usado para a detecção e quantificação do TBZ. Fonte: Autora.

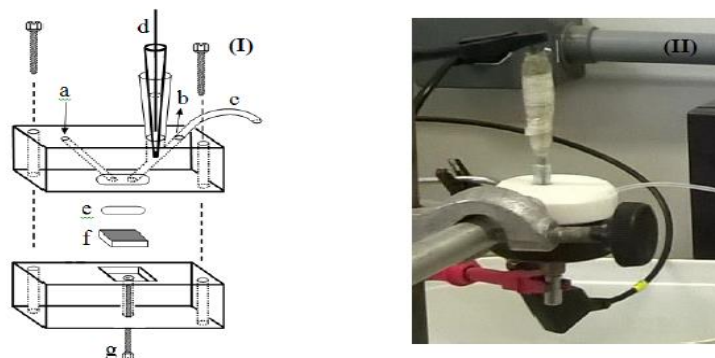


FIGURA 14: (I) Representação esquemática e (II) foto ilustrativo do sensor eletroquímico utilizado nas análises por CLAE/EC. Fonte: ANDRADE et al., 2009.

O detector eletroquímico (FIGURA 14-I) é constituído por dois pequenos blocos de Teflon[®], onde em um deles encontra-se o compartimento para o eletrodo de trabalho (f), de referência (d) e o contra eletrodo (c). Na parte inferior do detector, um parafuso fixado tem a função de fazer o contato elétrico com o eletrodo de trabalho (g). Um anel de silicone (e) fixado à base de um dos blocos é responsável pela vedação do sensor, impedindo que a solução (fase móvel) escape através da junção existente entre os dois blocos de Teflon[®]. Um canal de entrada (a) conduz a solução à superfície do eletrodo de trabalho e posteriormente a mesma passa por um canal de saída (c) (tubo de aço inoxidável) o qual também é utilizado como contra eletrodo.

O aparelho CLAE utilizado era 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 utilizada foi do tipo C8 (4,6 mm x 250 mm, ACE[®] 5 μm) com faixa de trabalho entre pH de 2 a 8. Alíquotas de 40 μL de amostra da EPN foram injetadas no sistema cromatográfico, a fim de encontrar o sinal analítico referente ao analito TBZ e, caso necessário, separá-lo dos possíveis interferentes da matriz. Para a otimização das condições cromatográficas utilizaram-se diferentes composições de fase móvel contendo tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ (pH 7) e ACN, a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹.

3.7.2 VOLTAMOGRAMA HIDRODINÂMICO

Após determinada as melhores condições cromatográficas, procedeu-se à obtenção da melhor condição do parâmetro de potencial aplicado (voltamograma hidrodinâmico) por

meio da técnica de amperometria em fluxo, variando-se os valores de potencial entre 1,10 V e 1,45 V x Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹).

Para isso, alíquotas de 100 µL do sobrenadante do tomate fortificado com 500 µL de TBZ (2,0 mmol L⁻¹) foram diluídas com 100 µL da fase móvel (Tampão Fosfato/ACN 57:43, V/V) e então injetadas no sistema CLAE/EC para obtenção do cronoamperograma para cada potencial estudado.

3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

3.8.1 CLAE/EC

Após o desenvolvimento de um método analítico, deve-se realizar uma avaliação sobre os diversos fatores experimentais que podem afetar a exatidão e a precisão dos resultados. Essa avaliação é denominada de validação, e está relacionada com a confiabilidade dos resultados (FREITAS, 2005; LEITE, 2002).

Uma vez determinada as melhores condições para a detecção do TBZ em amostra de tomates orgânicos a partir das condições cromatográficas, eletroquímica e de extração, foram avaliados alguns parâmetros de análise com a intenção de validar o método proposto, seguindo algumas indicações presentes em INMETRO (2016) e GARP (1999). Os parâmetros avaliados foram limite de detecção, limite de quantificação, curva analítica (com e sem EPN), precisão, exatidão intradia e interdia e estudo de interferentes. Além disso, o método foi aplicado para análise de tomates adquiridos em estabelecimentos comerciais localizados no município de Catalão-GO.

Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) é definido como a menor quantidade de analito que pode ser detectado pelo método, mas não necessariamente quantificado com um valor exato (RIBANI et al., 2004). Neste trabalho, o LD foi obtido pela relação sinal/ruído, considerando-se o sinal do pico de corrente como sendo, pelo menos, três vezes maior do que o sinal do ruído. Para isso, sucessivas injeções em triplicata foram feitas com diferentes concentrações do padrão do fungicida (INMETRO, 2016).

Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) é definido como a concentração do analito que pode ser quantificada na amostra com precisão e exatidão, dentro de condições analíticas definidas (LEITE, 2002). O critério adotado para determinar o LQ para o TBZ foi a relação sinal-ruído, considerando-se que a menor concentração da espécie analítica deve ser, no mínimo, 10 vezes maior que o sinal do ruído e pode ser determinada com reprodutibilidade maior ou igual a 75% (INMETRO, 2016). Para isso, sucessivas injeções realizadas em triplicata foram feitas em diferentes concentrações do padrão do fungicida.

Curva analítica (sem EPN)

Para a obtenção da curva analítica sem qualquer processo de extração, injeções do padrão do fungicida TBZ preparado na fase móvel (tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ e ACN na proporção 57:43 V/V) foram realizadas nas seguintes concentrações: 1,0 µg mL⁻¹; 3,0 µg mL⁻¹; 5,0 µg mL⁻¹; 7,0 µg mL⁻¹; 10,0 µg mL⁻¹; 13,0 µg mL⁻¹ e 20,0 µg mL⁻¹. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e cada ponto da curva foi obtido pela média aritmética do sinal de corrente registrado de cada injeção.

Curva analítica (com EPN)

A curva analítica com processo de EPN foi obtida a partir da determinação do sinal analítico referente ao TBZ extraído das amostras de tomate dopadas com concentrações nominais de TBZ de 0,125 µg mL⁻¹, 0,250 µg mL⁻¹, 0,500 µg mL⁻¹, 1,00 µg mL⁻¹, 1,50 µg mL⁻¹, 2,00 µg mL⁻¹ e 3,00 µg mL⁻¹. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e cada ponto da curva foi obtido pela média aritmética do sinal de corrente registrado de cada injeção.

Fator de Pré-Concentração

Para verificação da eficiência do processo de EPN, o fator de pré-concentração (F_C) foi determinado por meio da construção de uma curva analítica obtida com padrão de TBZ na faixa de 0,125 µg mL⁻¹ a 3,0 µg mL⁻¹ submetida ao procedimento de EPN, e uma segunda curva compreendendo em uma faixa de 1,0 µg mL⁻¹ a 20,0 µg mL⁻¹ obtida sem o

procedimento de EPN. O fator de pré-concentração foi obtido pela razão dos coeficientes angulares das curvas obtidas com e sem o processo de EPN (Equação 2).

Precisão e Exatidão

Em um método analítico, a exatidão está relacionada com a proximidade do valor por ele obtido com o valor considerado de referência. A exatidão pode ser expressa como a quantidade percentual de analito recuperada no processo de extração e pré-concentração por ponto nuvem, tal como descrito na Equação 3.

$$\mathbf{R (\%) = (C_{ob}/C_{ad}) \times 100} \quad \mathbf{(Equação 3)}$$

Onde R é a porcentagem de recuperação, C_{ob} (concentração obtida - ver seção 3.6.1) é a média aritmética do sinal de corrente registrado de cada injeção, C_{ad} (concentração adicionada) é o valor de referência adicionado.

Já a precisão é definida como uma medida do grau de aproximação dos resultados obtidos entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Normalmente, a precisão é expressa como coeficiente de variação (CV), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR), sendo calculado de acordo com a Equação 4.

$$\mathbf{CV (\%) = (DP/CMD) \times 100} \quad \mathbf{(Equação 4)}$$

Onde DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

Para avaliação da exatidão e precisão, o sobrenadante do tomate foi fortificado com TBZ em três níveis diferentes: i) nível baixo ($0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$), ii) nível intermediário ($1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$) e iii) nível alto ($3,00 \mu\text{g mL}^{-1}$). Foram realizadas análises intradia (realizadas no mesmo dia) e interdía (realizados em três dias consecutivos). Todas as análises foram feitas em triplicata para cada nível de concentração.

O critério de aceitação dos parâmetros de exatidão e precisão foi adotado com base nos valores de referência estabelecidos por GARP (1999), no qual considera-se aceitável o intervalo de recuperação em análises de resíduos de agrotóxicos entre 70% e 120%, com precisão $\pm 20\%$. Entretanto, para amostras muito complexas do ponto de vista analítico ou

mesmo do ponto de vista de matriz, valores de 50% a 120% e com precisão de até $\pm 15\%$ são considerados aceitáveis do ponto de vista de validação.

Estudo de Interferentes

A seletividade, também chamada de especificidade, é a capacidade do método em distinguir o analito de interesse de outras espécies presentes na amostra (HARRIS, 2012).

A influência de interferentes foi estudada pela adição de um segundo agrotóxico, o clopirifós (CPF). Sua escolha foi baseada na informação de que seu uso foi proibido no cultivo de tomate em 2004 pela ANVISA, e autorizado somente para tomate rasteiro, para fins industriais. Apesar disso, o uso do CPF ainda tem sido utilizado nas lavouras de tomate de mesa do Brasil. Este fato foi comprovado a partir das informações contidas no relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) publicado em 2016, onde o agrotóxico CPF obteve o maior índice de detecção irregular nas amostras de tomate analisadas (ANVISA, 2016).

O estudo do interferente foi realizado pelo procedimento de EPN em condições otimizadas em amostras de tomate orgânico nas seguintes condições: a) Sem a adição do agrotóxico CPF e adicionando-se 25 μL de TBZ na concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$; b) Adicionando-se somente 25 μL de CPF na concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$; c) Adicionando-se volumes iguais de 25 μL de TBZ e CPF na mesma concentração ($1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e d) Adicionando-se volume de 25 μL de TBZ na concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 250 μL de CPF na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em seguida, procedeu-se a análise por CLAE/EC para verificar o efeito do interferente no método desenvolvido.

3.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM TOMATES COMERCIAIS

A otimização e validação do método em tomates comerciais foram respaldadas pelas análises de tomates orgânicos, plantados e cultivados pela própria autora (Seção 3.2), os quais garantem a isenção de qualquer tipo de agrotóxico no fruto. Após realizada a validação do método proposto, foram adquiridas amostras de tomate de três estabelecimentos comerciais distintos e localizados na cidade de Catalão-GO, as quais foram denominadas de Comercial 01, Comercial 02, e Comercial 03. Foram separadas

quantidades de 100 g de cada amostra as quais foram, em seguida, trituradas e submetidas à EPN sem a adição de TBZ (branco) e pela adição de 25 μL de TBZ na concentração de 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as análises foram feitas em triplicata e nas condições previamente otimizadas. A aplicação do método foi feita tanto para condição em fluxo (CLAE/EC) como em batelada (VPD).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PERFIL E CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO TBZ

A voltametria cíclica tem como principal função gerar informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos sob diferentes condições. A FIGURA 15 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos pela variação do pH.

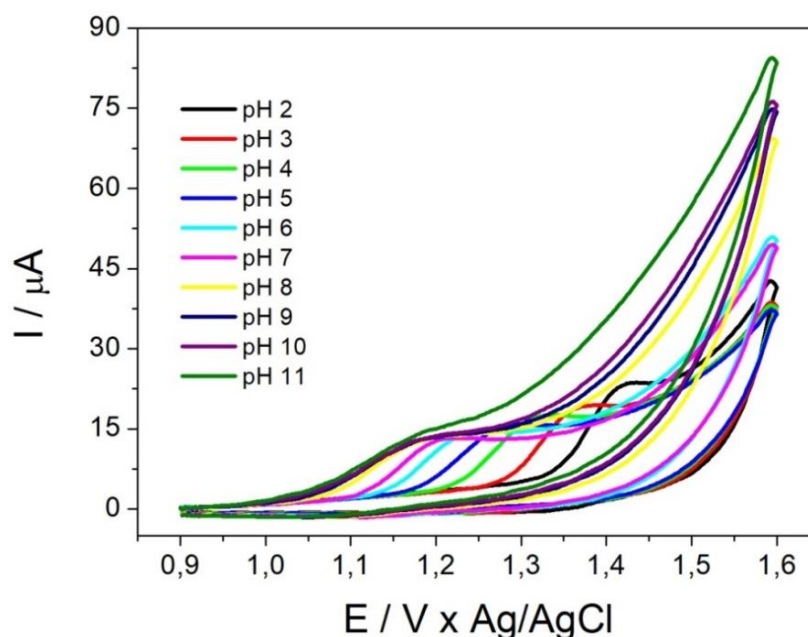


FIGURA 15: Voltamogramas cíclicos do fungicida TBZ $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes pH (de 2 a 11). Eletrodo de DDB. $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Observa-se na FIGURA 15 que com o aumento do pH do meio ocorreu um deslocamento para valores menos positivos de potencial. Além disso, os voltamogramas mostram que ao inverter o sentido da varredura nenhum sinal de corrente de pico catódico foi observado em toda faixa de pH investigada, indicando tratar-se de um processo irreversível.

Após a obtenção das informações e perfis voltamétricos para o TBZ, optou-se pelo uso da VPD por possibilitar a obtenção de voltamogramas melhor definidos e com maior sensibilidade, tal como já abordado anteriormente. Os parâmetros de VPD utilizados nesta medida (amplitude e escada de potencial) foram escolhidos por apresentarem sinais satisfatórios de detecção (a obtenção das melhores condições de VPD será mostrada em

seção adiante). As FIGURAS 16a e 16b mostram os resultados obtidos no estudo da influência do pH no comportamento voltamétrico do TBZ pela técnica de VPD.

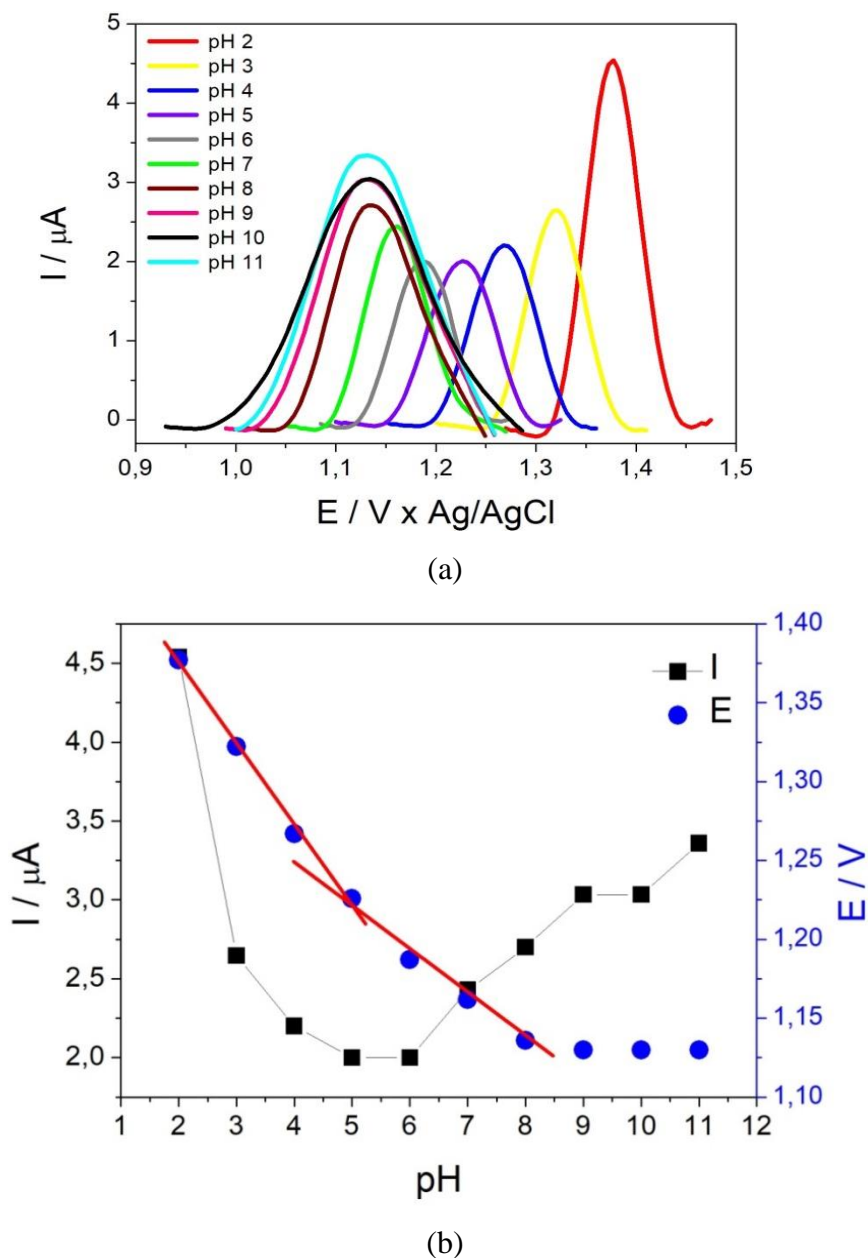


FIGURA 16: a) Voltamogramas de VPD do fungicida TBZ $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes pH (de 2 a 11) e b) Relação I_{p_a} x pH e E_p x pH obtidos da VPD do TBZ ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). $a = 50 \text{ mV}$, escada de potencial = 5 mV e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Conforme verificado na FIGURA 16a, relativo à oxidação do TBZ, é possível observar que os valores de potencial de pico anódico (E_{p_a}) deslocaram-se para valores menos positivos com o aumento do pH, tal como já esperado levando-se em conta os VC

mostrados na FIGURA 15. Isso pode ser atribuído a existência de uma reação de pré-protonação acoplada ao processo de transferência eletrônica evidenciando o envolvimento de íons H_3O^+ no processo de oxidação do TBZ. Além disso, é possível notar na FIGURA 16b uma mudança de inclinação de reta (E_p x pH) próximo de pH 5, a qual pode ser atribuída ao primeiro pK_a da molécula TBZ (4,6). O segundo pK_a da molécula de TBZ possui valor igual a 12 (MORAL, SICILIA e RUBIO, 2009; RIBEIRO, 2014) e não foi detectado nesta medida. A mudança de inclinação da curva E_p x pH (FIGURA 16b) observada próxima de pH 5 passou de 51 mV/pH (sugerindo a participação de número igual de prótons e elétrons na reação) para 30 mV/pH (o que estaria mais próximo de uma relação próton/elétron igual a 0,5). Ainda de acordo com a FIGURA 16b, pode-se observar que a partir de pH 8 o potencial de pico (E_p) deixa de ser dependente do pH, indicando que a partir daí o E_p não é mais afetado pela concentração de íons H^+ sugerindo a ausência de qualquer etapa de protonação no mecanismo de oxidação.

Assim, abaixo de pH 4,6 a molécula de TBZ estará majoritariamente em sua forma protonada (TBZ^+), acima de pH 4,6 a molécula estará majoritariamente em sua forma neutra (TBZ) e acima de pH 12 a estrutura predominante do TBZ em solução será a sua forma ionizada (TBZ^-). Um diagrama de distribuição das espécies TBZ presentes em solução foi construído com base no seu equilíbrio aquoso em função do pH do meio e dos pK_a apontados pela literatura e está apresentado na FIGURA 17.

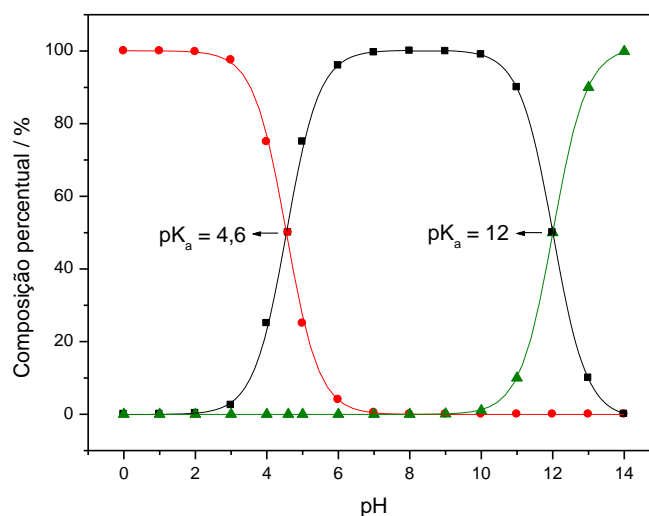


FIGURA 17: Diagrama de distribuição das espécies em função do pH para TBZ. (●) TBZ^+ , (■) TBZ e (▲) TBZ^- .

Com relação à I_p , a FIGURA 16a mostra claramente um decaimento significativo de seu valor até pH 6. A explicação para este comportamento pode ser feita baseada em estudos de impedância eletroquímica com TBZ (e também sobre DDB) realizado por Ribeiro (2014), nos quais foi demonstrado que em um intervalo de pH entre 2 e 6 houve um aumento da resistência à transferência de carga, o que levou a uma diminuição na cinética de transferência de carga com o aumento do pH. Em outras palavras, se a cinética de transferência de carga diminui com o aumento do pH (na faixa de 2 a 6), então a intensidade de sinal também deve diminuir como consequência da diminuição da quantidade de TBZ^+ em relação à do TBZ. De acordo com o diagrama da FIGURA 17, é possível observar que a partir de pH 6 mais de 97% do TBZ encontra-se em sua forma neutra. Assim, considerando-se os resultados mostrados na FIGURA 16a e o diagrama da FIGURA 17 torna-se possível inferir que a espécie TBZ^+ deve possuir atividade eletroquímica maior do que a neutra, pois quanto mais ela está presente em relação à espécie neutra, maior é o sinal de corrente obtido. Já o aumento da I_p observado a partir de pH 6 (FIGURA 16a) deve ser atribuído à oxidação da espécie neutra (TBZ) à sua forma ionizada (TBZ^-). A FIGURA 18 mostra as estruturas químicas das espécies de TBZ existentes em equilíbrios aquosos em diferentes pH.

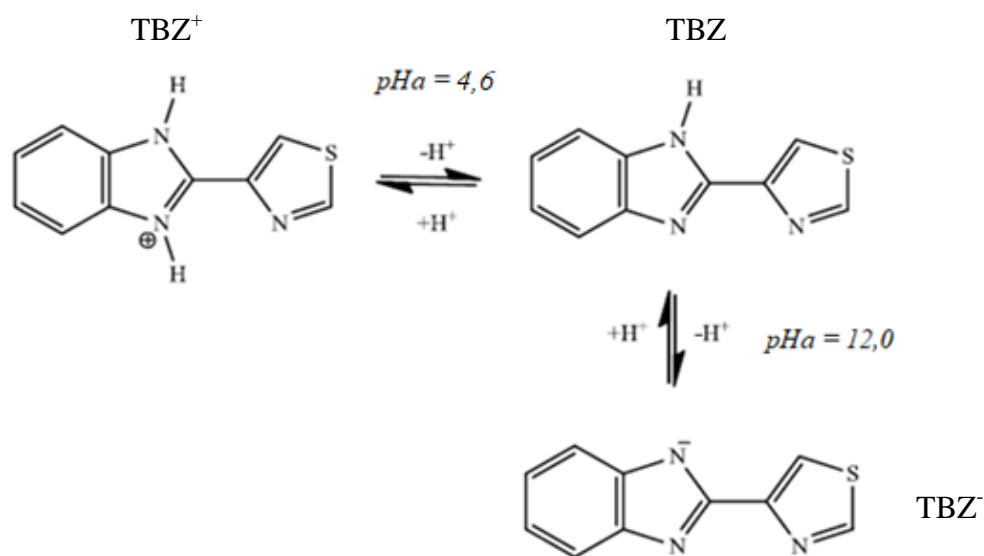


FIGURA 18: Estruturas químicas das espécies formadas em diferentes valores de pH.
 Fonte: RIBEIRO, 2014.

Uma vez caracterizado o perfil eletroquímico envolvido no processo de oxidação do TBZ, a próxima etapa do trabalho envolvia a determinação de TBZ extraído de amostras de tomate por ponto nuvem. Por se tratar de uma amostra real, optou-se por trabalhar os parâmetros envolvidos na técnica de EPN utilizando a técnica de CLAE/EC no sentido de possibilitar eliminação dos possíveis (e prováveis) interferentes naturais pertencentes à amostra. Para isso, as condições cromatográficas necessitaram ser primeiramente avaliadas, as quais estão descritas na seção a seguir.

4.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Embora os estudos voltamétricos realizados tenham mostrado maior sinal de corrente em pH 2, esta condição não foi escolhida para trabalhar com a técnica de CLAE/EC por ser considerada extrema para a coluna cromatográfica utilizada, a qual possui faixa de pH indicada pelo fabricante entre 2 e 8. Assim, considerando-se que a pequena diferença entre os sinais de corrente obtidos em pH 3 e pH 7 (FIGURA 16b), optou-se por trabalhar em pH 7 devido a maior facilidade de oxidação do TBZ (menor potencial), a qual também resulta na obtenção de menor corrente de fundo, e também porque esta condição resulta na menor formação de bolhas de oxigênio dentro da célula de detecção eletroquímica (os potenciais de oxidação de TBZ e de geração de O₂ estão mais distantes um do outro em pH 7), promovida pela reação de oxidação da água presente na fase móvel, e que poderia causar oscilação no sinal de corrente obtido. A condição de potencial aplicado nesta avaliação foi adotada considerando-se que o valor de 1,5 V x Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹) era superior àquele suficiente para oxidação do TBZ.

Assim, para a obtenção das melhores condições cromatográficas foram utilizadas diferentes composições de fase móvel nas proporções (V:V) de Tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ (pH 7):ACN em 55:45, 56:44, 57:43, 58:42, 59:41, 60:40 e 62:38 a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹. Os cromatogramas com detecção eletroquímica utilizando as diferentes composições de fase móvel estão mostrados na FIGURA 19.

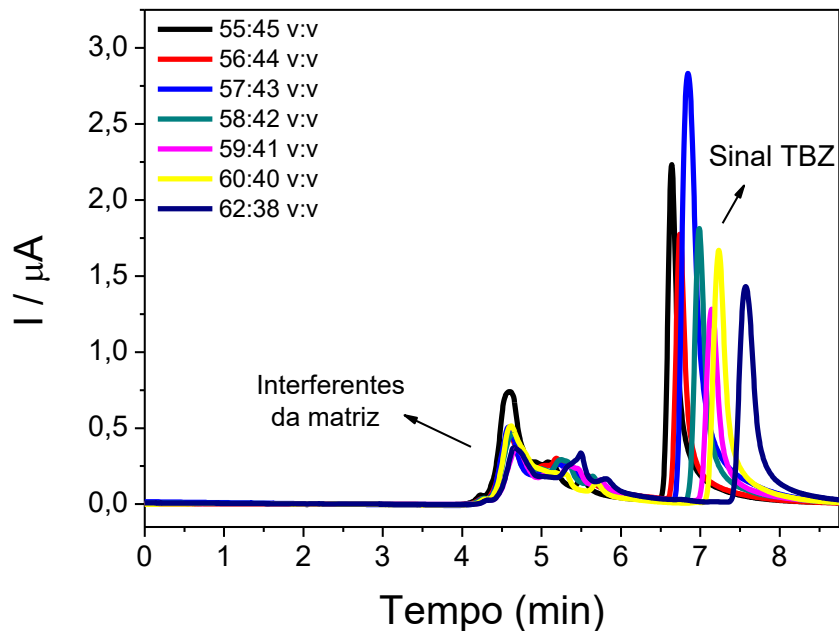


FIGURA 19: Cromatogramas obtidos por detecção eletroquímica após EPN em tomate fortificado com 500 μL de TBZ ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$). Eletrólito suporte: fase móvel tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0):ACN em diferentes composições de fase móvel. $E = 1,5 \text{ V}$ x Ag/AgCl. Volume de injeção de 20 μL .

De acordo com os cromatogramas mostrados na FIGURA 19, pode-se observar a presença de alguns picos iniciais referentes aos interferentes da matriz (tomate orgânico) e, em seguida, os picos referentes ao TBZ obtidos em cada condição de fase móvel. É possível notar também a formação de picos referentes ao TBZ bem definidos, os quais são deslocados para menores tempos de retenção à medida que a força da fase móvel aumenta, tal como esperado. Os sinais de corrente obtidos para cada condição parecem não ter uma relação direta com a composição da fase móvel, uma vez que eles são oscilantes. Assim, considerando-se a maior distância entre o pico referente ao TBZ e os interferentes da matriz bem como o sinal de corrente obtido, a fase móvel considerada mais adequada para as análises cromatográficas foi de 57:43. A FIGURA 20 mostra ainda os cromatogramas com detecção eletroquímica obtidos com a amostra após procedimento de EPN na ausência de TBZ (branco), na presença de TBZ e após fortificação da amostra com solução padrão de TBZ. Este procedimento de fortificação de amostra foi feito para fins de confirmação de que se tratava, de fato, do sinal analítico referente ao TBZ. É importante ressaltar que como

os tempos de detecção amperométrica e por UV (ambos via CLAE) não eram precisamente sincronizados, os tempos de retenção mostrados na FIGURA 20 não são representativos. Nesse sentido, o cromatograma registrado pela detecção do tipo UV mostrado na FIGURA 21 confirma que o tempo de retenção do TBZ na condição de fase móvel considerada mais adequada (57:43) foi de apenas 4,6 min, o que do ponto de vista de frequência analítica é bastante interessante.

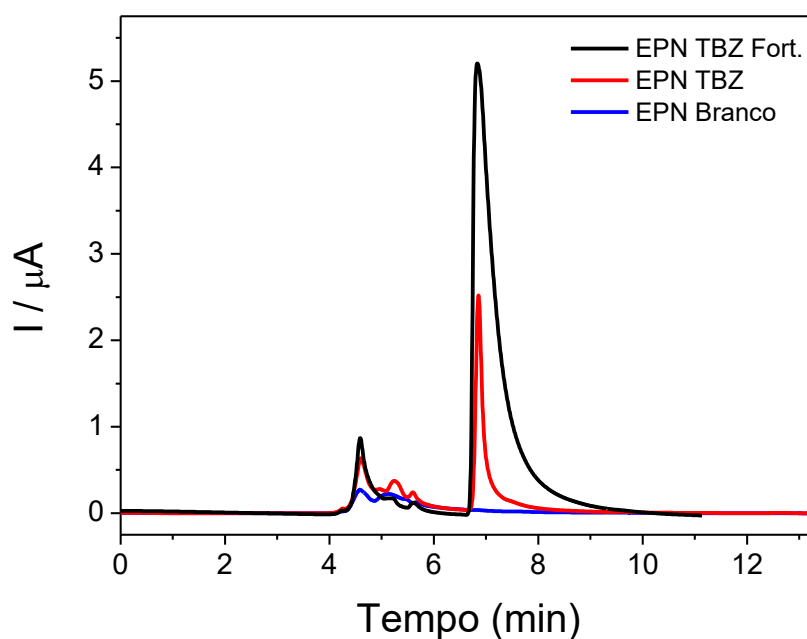


FIGURA 20: Cromatogramas obtidos por detecção eletroquímica após procedimento de EPN em tomate na ausência de TBZ (branco, curva em azul), na presença de TBZ (curva em vermelho) e após fortificação da amostra com adição de 50 μL solução padrão de TBZ (curva em preto). Eletrólito suporte: fase móvel tampão fosfato (0,01 mol L⁻¹, pH 7,0):ACN na proporção 57:43 (V/V), volume de injeção de 20 μL e $E = 1,5 \text{ V x Ag/AgCl}$.

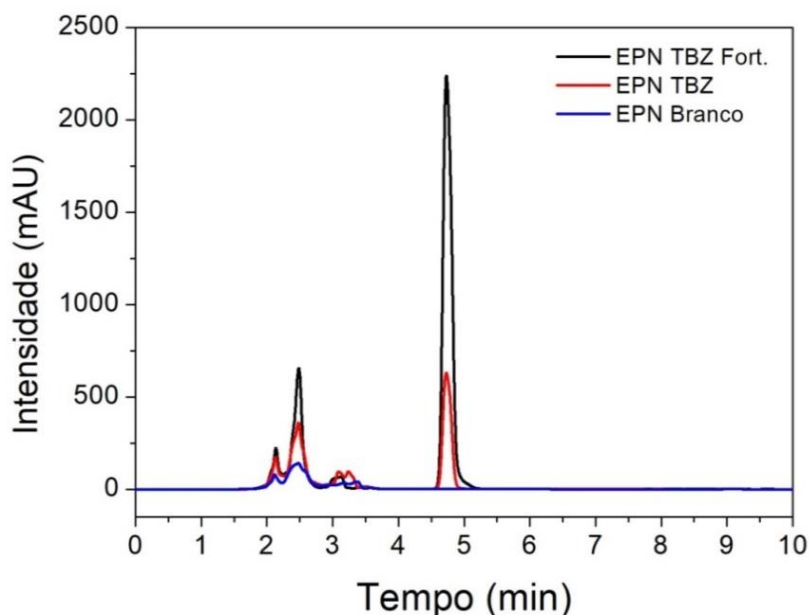


FIGURA 21: Cromatogramas obtidos por CLAE-UV após procedimento de EPN em tomate na ausência de TBZ (branco, curva em azul), na presença de TBZ (curva em vermelho) e após fortificação da amostra com adição de 50 μL solução padrão de TBZ (curva em preto). Eletrólito suporte: fase móvel tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0):ACN na proporção 57:43 (V/V), volume de injeção de 20 μL e $\lambda = 274 \text{ nm}$.

4.2.1 VOLTAMOGRAMA HIDRODINÂMICO

Após determinação da melhor condição cromatográfica, procedeu-se à obtenção da melhor condição do potencial a ser aplicado na técnica de amperométrica. Para isso, um voltamograma hidrodinâmico foi construído variando-se os valores de potencial aplicado entre 1,10 V e 1,45 V x Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$), tal como mostrado na FIGURA 22.

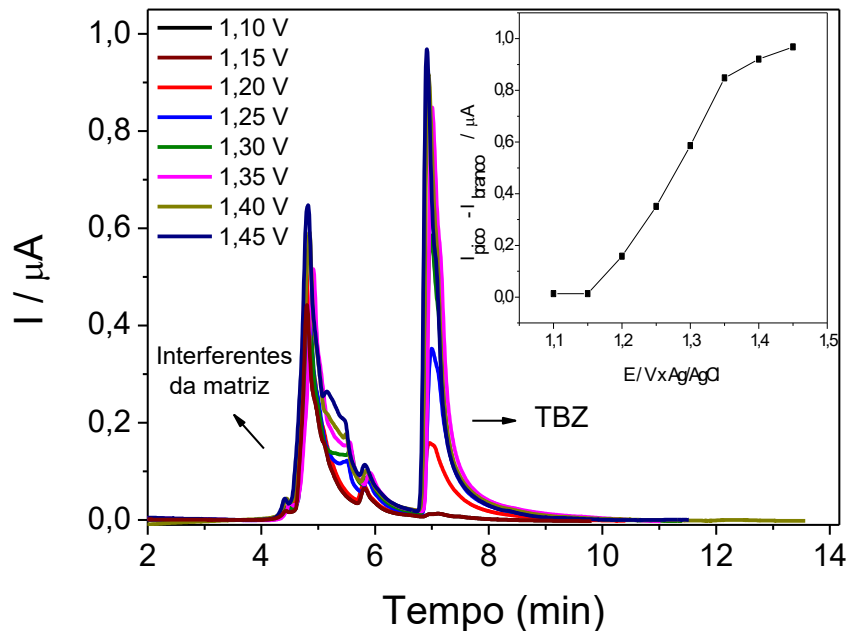


FIGURA 22: Cromatogramas obtidos por detecção eletroquímica após EPN e na figura inserida encontra-se voltamograma hidrodinâmico obtido para o TBZ. Eletrólito suporte: fase móvel tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0):ACN na proporção 57:43 (V/V) e volume de injeção de $20 \mu\text{L}$.

De acordo com o voltamograma hidrodinâmico mostrado FIGURA 22 (inserida), é possível observar a variação do sinal eletroquímico do TBZ obtido em cada potencial estudado. O sinal de corrente referente à oxidação do TBZ aumenta à medida que o potencial aplicado é alterado para valores mais positivos, tendendo a um patamar partir do potencial de $1,35 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Este comportamento deve-se à limitações referente ao transporte de massa do TBZ à superfície do eletrodo (difusão). Como não há grandes variações de sinal de corrente acima desse valor e levando-se em conta às questões relacionadas ao desprendimento de gás já mencionadas, o potencial mais adequado para ser empregado na detecção eletroquímica do fungicida TBZ foi considerado ser de $1,35 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Além disso, é importante ressaltar que não apenas o sinal do TBZ aumenta com o aumento do potencial aplicado, mas também, o sinal dos interferentes presentes da amostra. Portanto, o fato dos interferentes da amostra também apresentarem atividade eletroquímica já se configuraria como um forte indicativo de que análises em batelada por voltametria devem ser dificultadas.

4.3 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA EPN

4.3.1 VARIAÇÃO DO pH DO SOBRENADANTE

O primeiro parâmetro a ser avaliado na otimização do processo de EPN foi o pH do sobrenadante. Para isso, as melhores condições cromatográficas e eletroquímicas foram empregadas neste estudo no sentido de verificar se haveria melhora do sinal analítico do TBZ e/ou diminuição no sinal dos interferentes. Os resultados desta medida estão mostrados na FIGURA 23.

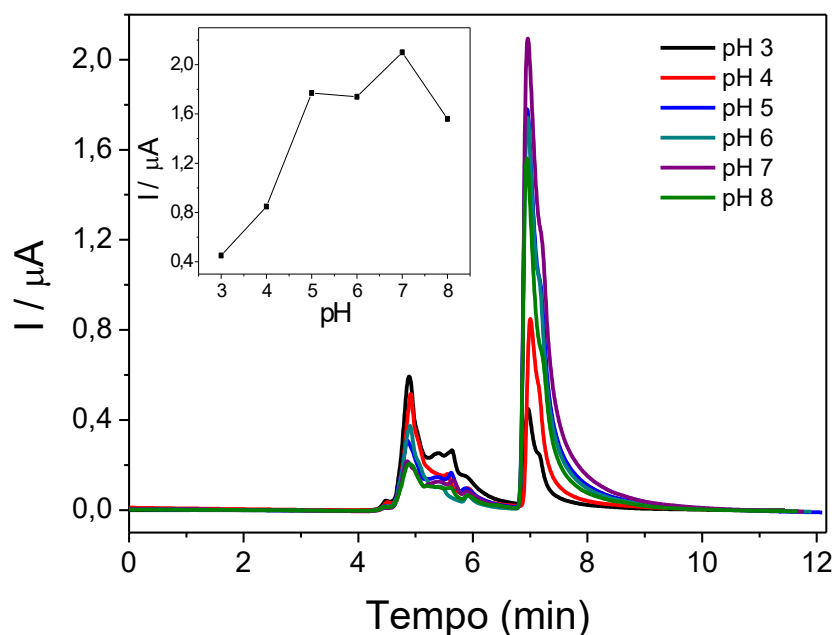


FIGURA 23: Cromatogramas obtidos por detecção eletroquímica após EPN em tomate contendo 500 μL de TBZ ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$) em diferentes pH de sobrenadante do tomate. Eletrólito suporte: fase móvel tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0):ACN na proporção de 57:43 (V/V), volume de injeção de 20 μL . $E = 1,35 \text{ V x Ag/AgCl}$.

A FIGURA 23 mostra que em toda faixa de pH estudada (3,0 a 8,0) o sinal dos interferentes presentes na matriz são diminuídos com o aumento do pH (os quais foram ajustado com NaOH ou HCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$). Além disso, observa-se um aumento na intensidade de corrente referente ao sinal de TBZ até pH neutro com posterior diminuição em pH 8. O uso do surfactante de Tergitol como solvente em processos de EPN de compostos orgânicos não tem sido muito relatado na literatura dos últimos anos (AMORIM et al., 2017; LIU et al., 2014; CHEN et al., 2012; ZOU et al., 2012; MARTINS et al., 2011;

PRAK et al., 2010; LI et al., 2008; BAI, et al., 2001). De acordo com FERRERA et al. (2004), em processos de EPN o pH das amostras deve ser ajustado preferencialmente de forma a priorizar a forma molecular do analito em sua forma neutra, considerando sua maior afinidade com agregados micelares não iônicos nestas condições. Portanto, maiores eficiências de extração deveriam ser, de fato, esperadas, quando o pH das amostras de tomate estivesse em um intervalo compreendido na faixa de 6 a 10, pois nesta condições a espécie TBZ encontra-se majoritariamente em sua forma neutra (ver FIGURA 17). Assim, acredita-se que o efeito do pH das amostras sobre a resposta eletroquímica do TBZ nas análises mostradas na FIGURA 23 representem um balanço entre a eficiência do mecanismo de formação de micelas em diferentes pH e a afinidade dos analitos por elas. É importante ressaltar que o uso de condições de pH neutro em estudos envolvendo EPN de moléculas orgânicas com Tergitol mostrou ser a melhor condição, não apenas neste estudo, mas em outros trabalhos que mencionaram o efeito do pH (LIU et al., 2014; ZOU et al., 2012). Dessa forma, a condição de pH de sobrenadante considerada a mais adequada para ser utilizada no processo de EPN foi aquela realizada em condição neutra. Nessa condição, o sinal analítico é máximo e o sinal dos interferentes é minimizado.

4.3.2 PLANEJAMENTO FATORIAL

Após definidas as melhores condições cromatográficas, eletroquímicas e de pH do sobrenadante do tomate para a determinação do TBZ, procedeu-se à otimização dos outros parâmetros da extração por ponto nuvem (EPN) utilizando-se um planejamento fatorial 2^4 completo. Em um planejamento fatorial completo avaliam-se os efeitos que as variáveis exercem uma sobre as outras com o resultado final. A organização do experimento visa obter as combinações possíveis entre as variáveis estudadas e seus os níveis. Os níveis são representados, por convenção pelos sinais (-) e (+) que representam o nível mais baixo (-) e o nível mais alto (+) das variáveis. Além do nível alto e baixo, também é estudado o nível intermediário entre os valores inicialmente definidos (CALADO & MONTGOMERY, 2003). Para obtenção de respostas significativas, é necessário fazer um levantamento preliminar das variáveis mais expressivas e identificar os níveis mais adequados para cada variável. Assim, a escolha dos valores foi definida no sentido de obter a melhor condição para trabalho visando rapidez, economia de reagente e eficiência no processo experimental

de EPN. O planejamento fatorial empregado neste trabalho foi construído com base na variação e interação entre 4 parâmetros investigados, os quais estão mostrados na TABELA 5, juntamente com os valores de sinal de corrente obtidos como resposta para cada ensaio.

TABELA 5: Resultado do planejamento fatorial 2^4 para estudo da extração e pré-concentração por ponto nuvem do TBZ em tomate.

<i>Experimento</i>	<i>Tergitol TMN-6 (% V/V)</i>	<i>NaCl / g</i>	<i>t / min</i>	<i>θ / °C</i>	<i>I / μA</i>
1	10 (-)	0,4 (-)	15 (-)	36 (-)	1,32
2	30 (+)	0,4 (-)	15 (-)	36 (-)	1,20
3	10 (-)	0,6 (+)	15 (-)	36 (-)	1,45
4	30 (+)	0,6 (+)	15 (-)	36 (-)	1,23
5	10 (-)	0,4 (-)	45 (+)	36 (-)	1,44
6	30 (+)	0,4 (-)	45 (+)	36 (-)	1,11
7	10 (-)	0,6 (+)	45 (+)	36 (-)	1,54
8	30 (+)	0,6 (+)	45 (+)	36 (-)	1,26
9	10 (-)	0,4 (-)	15 (-)	40(+)	1,45
10	30 (+)	0,4 (-)	15 (-)	40(+)	0,85
11	10 (-)	0,6 (+)	15 (-)	40(+)	1,68
12	30 (+)	0,6 (+)	15 (-)	40(+)	1,17
13	10 (-)	0,4 (-)	45 (+)	40(+)	1,38
14	30 (+)	0,4 (-)	45 (+)	40(+)	1,03
15	10 (-)	0,6 (+)	45 (+)	40(+)	1,59
16	30 (+)	0,6 (+)	45 (+)	40(+)	1,30
17 (C)	20 (\pm)	0,5 (\pm)	30 (\pm)	38 (\pm)	1,29
18 (C)	20 (\pm)	0,5 (\pm)	30 (\pm)	38 (\pm)	1,41

A escolha da faixa de concentrações (em % V/V) do surfactante Tergitol (10% em nível baixo, 20% em nível intermediário e 30% em nível alto) mostradas na TABELA 5 foi baseada no fato de que este parâmetro tem influência direta no fator de pré-concentração. No caso da temperatura, como a temperatura de formação de ponto nuvem do Tergitol TMN-6 é 36 °C (WANG & DAI, 2010), este valor foi escolhido como nível baixo. Buscando manter a eficiência do processo, não foram estudadas temperaturas muito além do ponto nuvem. Sendo assim, o nível alto para a temperatura foi 40 °C e o intermediário de 38 °C. O tempo de ultrassom foi definido aleatoriamente compreendendo uma faixa maior (15 min a 45 min) de estudo, com a intenção de verificar o tempo mais adequado no qual as amostras devem ser submetidas à radiação ultrassônica. Por último, sabendo-se que as condições do meio podem ser alteradas com a força iônica da solução, a adição de NaCl foi

empregada para diminuir a temperatura de ponto nuvem, permitindo que a solução micelar se separasse em uma fase rica de surfactante (menor volume) e outra pobre em surfactante (maior volume). Assim, a quantidade de NaCl foi estudada nas faixas de 0,4 g (nível baixo), 0,5 g (intermediário) e 0,6 g (nível alto).

A partir das respostas em corrente encontradas nos experimentos realizados por meio do planejamento fatorial mostrado na TABELA 5, os efeitos das variáveis e suas interações puderam ser representados pelo gráfico de Pareto com nível de confiança igual a 95% ($p = 0,05$), conforme mostra a FIGURA 24. Por meio deste gráfico é possível avaliar o que acontece com a resposta quando ocorre a mudança do nível (-) para o nível (+), ou seja, o comportamento causado por cada uma das variáveis (efeito principal) e o comportamento causado pela interação entre as variáveis (efeito de interação). Além disso, o gráfico de Pareto mostra de forma clara e rápida os efeitos e suas interações que são estatisticamente importantes, de tal forma que se suas barras estiverem à direita da linha divisória ($p = 0,05$) a interação deve ser considerada significativa no modelo matemático. Os valores localizados ao lado de cada barra representam a estatística do teste t , que faz a comparação das médias dos resultados. O teste F faz a comparação das variâncias, e por isso, a significância dos resultados ($p > 0,05$), é controlado através do mesmo (CALADO & MONTGOMERY, 2003).

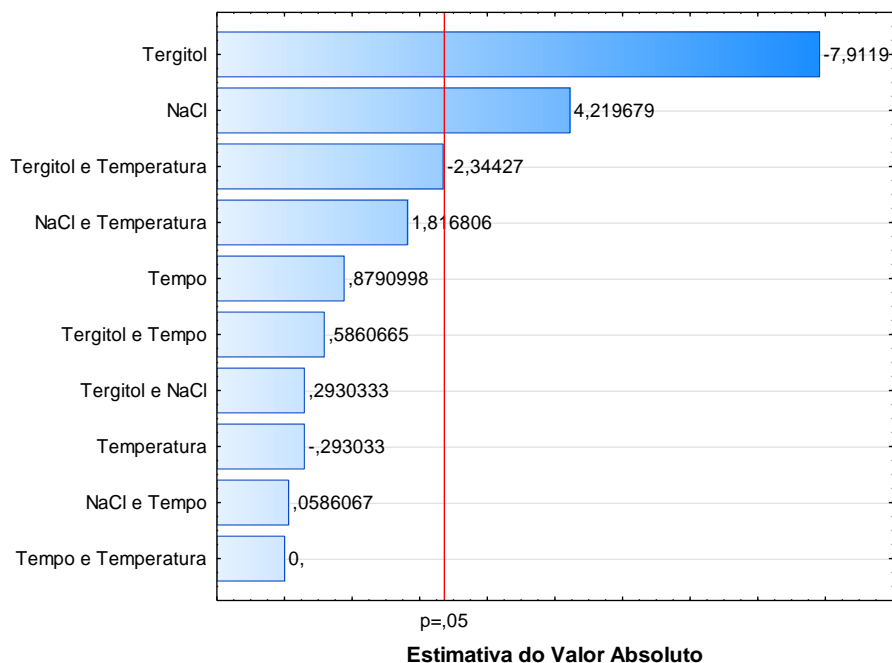


FIGURA 24: Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento fatorial 2^4 completo referente aos efeitos para as variáveis da EPN em tomate fortificado com TBZ. A resposta utilizada foi o sinal de corrente. Nível de confiança de 95%.

A partir do gráfico de Pareto mostrado na FIGURA 24 é possível observar que as variáveis tempo e temperatura não foram estatisticamente significativas no modelo proposto. Portanto, as melhores condições de tempo e temperatura foram consideradas ser de 15 min (menor tempo) e 36 °C, respectivamente. O efeito principal das variáveis Tergitol e NaCl apresentaram-se estatisticamente significativas para o matemático proposto, e por esse motivo, devem ser estudadas com mais detalhes, para obtenção dos valores ótimos que irão proporcionar melhor sinal analítico. É importante ressaltar também que o valor localizado ao lado da barra do Tergitol da FIGURA 24 está com o sinal negativo. Esta informação sugere que o teor percentual de surfactante utilizado no processo de EPN deve ser diminuído para obtenção de melhores resultados. De fato, a adição excessiva de surfactante pode resultar na formação de uma fase rica de maior volume, causando um efeito de diluição do analito e, conseqüentemente, a diminuição do fator de pré-concentração. Os resultados da tabela ANOVA dos quais foram gerados o gráfico de Pareto (FIGURA 24), mostra que o valor de coeficiente de determinação (R-sqr) foi de $0,9282 \pm 0,007279$ (Ms Residual), comprovando que o modelo matemático proposto é

válido. Com base nestas informações, foi possível propor uma matriz para planejamento de composto central, tal como descrito na TABELA 6, juntamente com os valores de sinal de corrente obtidos para cada ensaio. A FIGURA 25 mostra a superfície de resposta obtida a partir dos resultados da TABELA 6.

TABELA 6: Resultado do planejamento de composto central para estudo da extração e pré-concentração por ponto nuvem do TBZ em tomate.

Experimento	Tergitol TMN-6 (% V/V)	NaCl / g	$I / \mu\text{A}$
1	8,0	0,4	1,47
2	8,0	1,2	1,94
3	20,0	0,4	0,89
4	20,0	1,2	1,68
5 (C)	14,0	0,8	1,77
6	5,51	0,8	1,47
7	22,48	0,8	1,27
8	14,0	0,234	0,235
9	14,0	1,365	1,56
10 (C)	14,0	0,8	1,68

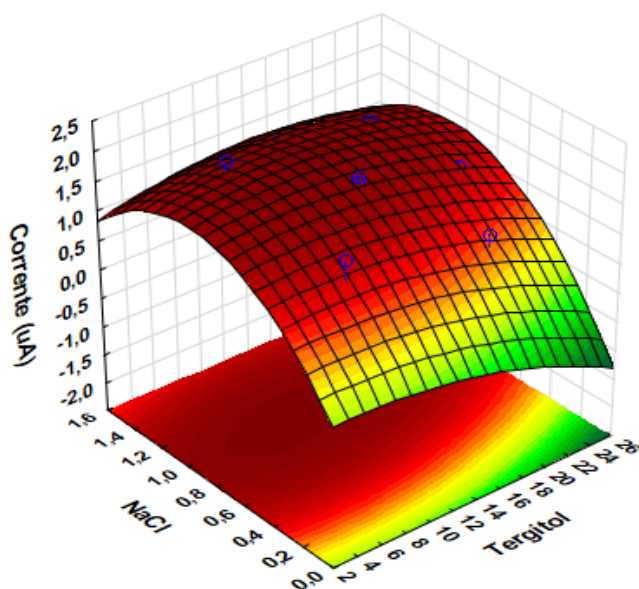


FIGURA 25: Superfície de resposta obtida a partir dos resultados da TABELA 6, para otimização do teor de Tergitol TNM-6 e da quantidade de NaCl, tendo como resposta analítica o sinal de corrente do TBZ.

A partir da FIGURA 25 é possível perceber a região de máximo, a qual representa a condição com possibilidade de obtenção de maior sinal de corrente para o TBZ. Essa região é evidenciada pelo destaque na cor vermelha escura do gráfico, a qual revela que a melhor condição (pode ser alcançada pela adição de 1,0 g de NaCl para uma solução de Tergitol com teor percentual de 10,6 %).

Uma vez encontrada a melhor condição para realização da EPN, foi dado continuidade ao processo de validação do método proposto. No entanto, é importante ressaltar que os valores anteriormente citados como as melhores condições são teóricos, ou seja, eles são considerados com base no modelo matemático empregado. Entretanto, ao realizar o experimento nas referidas condições, não foi observada separação entre as fases rica e pobre em surfactante. Esse fato pode ter ocorrido devido ao excesso de sal que diminuiu a temperatura de formação do ponto nuvem. A adição de NaCl diminuiu o teor de água dentro da micela devido à sua característica dessecante, fazendo com que o volume de fase rica seja menor e, conseqüentemente, seja obtido um maior fator de pré-concentração (ROCHA, 2013). Entretanto, quando o sal é adicionado em excesso há uma diminuição da temperatura de formação do ponto nuvem (TPN) para valores abaixo da temperatura ambiente, o que impede a separação de fases e impossibilita o uso da técnica de EPN. Assim, como não foi possível ocorrer a separação de fases na EPN com a melhor condição sugerida pelo planejamento de composto central, foi construída uma nova tabela alterando as quantidades de NaCl, tal como mostrado na TABELA 7, juntamente com os valores de sinal de corrente obtidos para cada ensaio. A FIGURA 26 mostra a superfície de resposta obtida a partir dos resultados da TABELA 7.

TABELA 7: Resultado do planejamento de composto central para estudo da extração e pré-concentração por ponto nuvem do TBZ em tomate.

<i>Experimento</i>	<i>Tergitol TMN-6 (% V/V)</i>	<i>NaCl / g</i>	<i>I / μA</i>
1	8,0	0,4	1,30
2	8,0	0,8	1,78
3	20,0	0,4	1,52
4	20,0	0,8	2,23
5 (C)	14,0	0,6	1,80
6	5,51	0,6	1,84
7	22,48	0,6	1,90
8	14,0	0,317	0,718

9	14,0	0,883	2,52
10 (C)	14,0	0,6	2,29

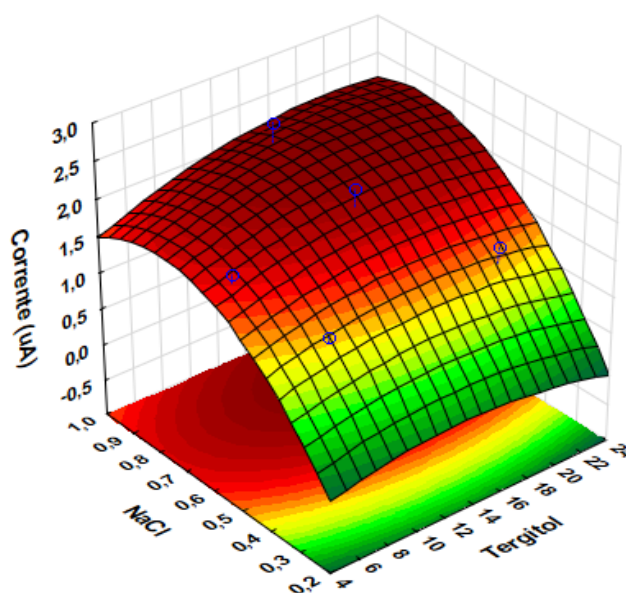


FIGURA 26: Superfície de resposta obtida a partir dos resultados da TABELA 7 para otimização do teor de Tergitol TNM-6 e da quantidade de NaCl, tendo como resposta analítica o sinal de corrente do TBZ.

De acordo com o gráfico de superfície de resposta (FIGURA 26), o ponto de máximo (região onde encontra-se maior intensidade de corrente) pode ser observado quando a quantidade de sal e o teor percentual de Tergitol utilizados no processo de EPN estão em 0,83 g e 19%, respectivamente. Como as demais variáveis já haviam sido definidas anteriormente, a TABELA 8 sumariza as condições otimizadas para a extração de TBZ em tomate a partir da técnica de EPN.

TABELA 8: Condições finais otimizadas para extração e pré-concentração do TBZ por ponto nuvem em tomate.

Parâmetro	Valor Ótimo
Tergitol TMN-6 / (% V/V)	19
NaCl / g	0,83
θ / °C	36
t / min	15

A utilização do planejamento fatorial proporcionou encontrar a melhor condição para EPN utilizando uma quantidade menor de experimentos, que resultou em diminuição de tempo e temperatura. Assim, uma vez otimizados todos os parâmetros relacionados à determinação eletroquímica de TBZ (por CLAE/EC) extraído de amostras de tomates por EPN, o método foi devidamente validado segundo critérios de aceitação contidos em INMETRO (2016) e GARP (1999).

4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

4.4.1 CLAE/EC

Para verificação da eficiência da EPN, o fator de pré-concentração (F_C) foi calculado (Seção 3.6.1) a partir da construção de uma curva analítica obtida com TBZ na faixa de $0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ submetida ao procedimento de extração e pré-concentração por ponto nuvem, e outra compreendendo a faixa de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ obtida sem o procedimento de extração e pré-concentração. As FIGURAS 27 e 28 mostram as curvas analíticas obtidas com e sem o procedimento EPN, respectivamente. As equações de reta e os coeficientes de correlação obtidos referentes a cada determinação estão expostos nas próprias curvas analíticas mostradas nas FIGURAS 27 e 28. Os valores obtidos confirmam a excelente linearidade do método dentro da faixa estudada. Os valores das inclinações das curvas analíticas com e sem o procedimento de extração e pré-concentração ($0,10141 \mu\text{A}/\mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,01784 \mu\text{A}/\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) permitiram determinar o fator de pré-concentração da extração, o qual foi de 5,7. Ou seja, a utilização da técnica EPN permite extrair e pré-concentrar a amostra em aproximadamente seis vezes. Este valor de fator de pré-concentração foi considerado muito bom, principalmente considerando-se à complexidade da matriz analisada, uma vez que vários elementos constituintes do fruto podem interferir no resultado final da análise (ALVES et al., 2010 e VIEIRA & LICHTIG, 2004).

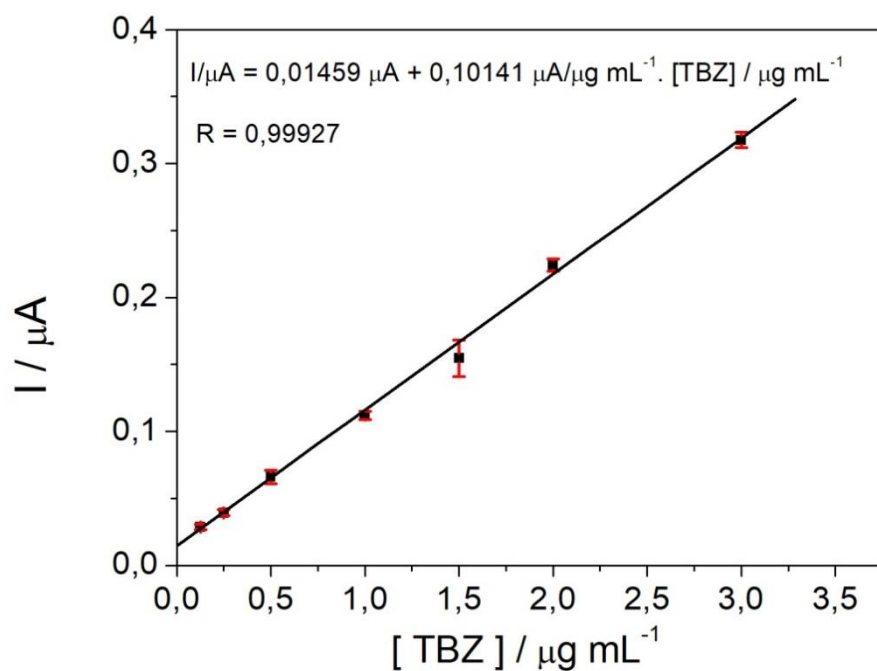


FIGURA 27: Curva analítica obtida em condição otimizada com procedimento de EPN. Eletrólito suporte: fase móvel tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0):ACN na proporção 57:43 (V/V), volume de injeção de $20 \mu\text{L}$. $E = 1,35 \text{ V x Ag/AgCl}$.

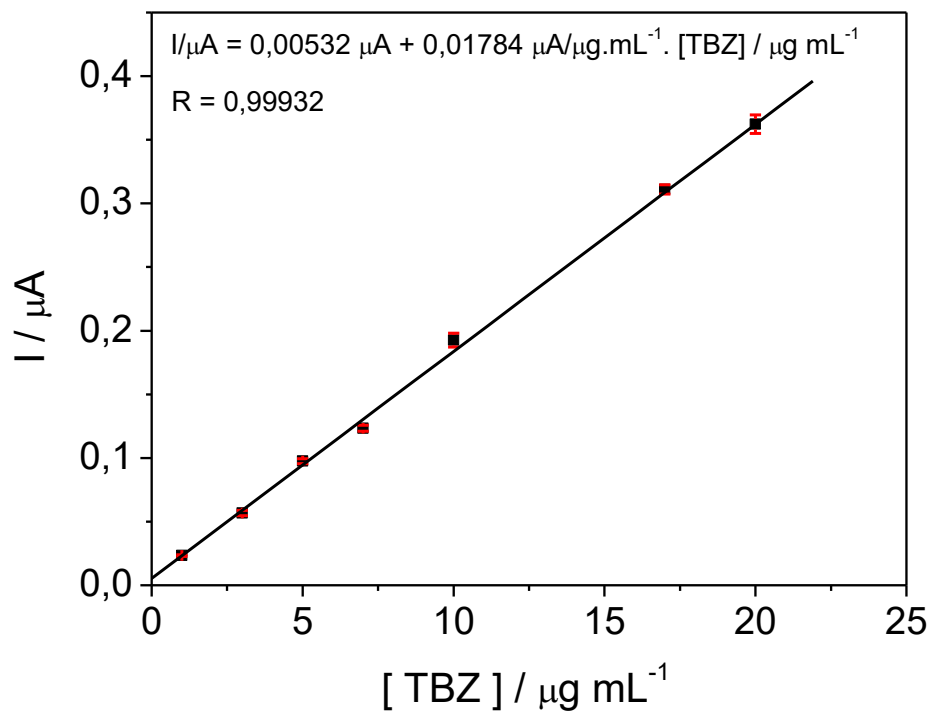


FIGURA 28: Curva analítica obtida em condição otimizada sem procedimento de EPN. Eletrólito suporte: fase móvel tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0):ACN na proporção 57:43 (V/V), volume de injeção de $20 \mu\text{L}$. $E = 1,35 \text{ V x Ag/AgCl}$.

O limite de detecção (LD) foi obtido considerando-se a concentração correspondente ao sinal de detecção como sendo, no mínimo, três vezes maior que o sinal do ruído. Como as concentrações resultantes das adições do fungicida na obtenção do LD e do LQ (C_C , Equação 2) foram de $0,0312 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,0625 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, os valores correspondentes ao LD e LQ (C_{ob} , Equação 2) para o agrotóxico TBZ em amostras de tomate utilizando o processo de EPN foram de $5,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ($2,7 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) e $11 \mu\text{g L}^{-1}$ ($5,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$), na mesma ordem. O cromatograma com detecção eletroquímica referente à medida de obtenção do LD está mostrado na FIGURA 29 e a TABELA 9 resume os principais resultados encontrados na literatura relacionados à determinação de TBZ em matrizes diversas, para fins de comparação.

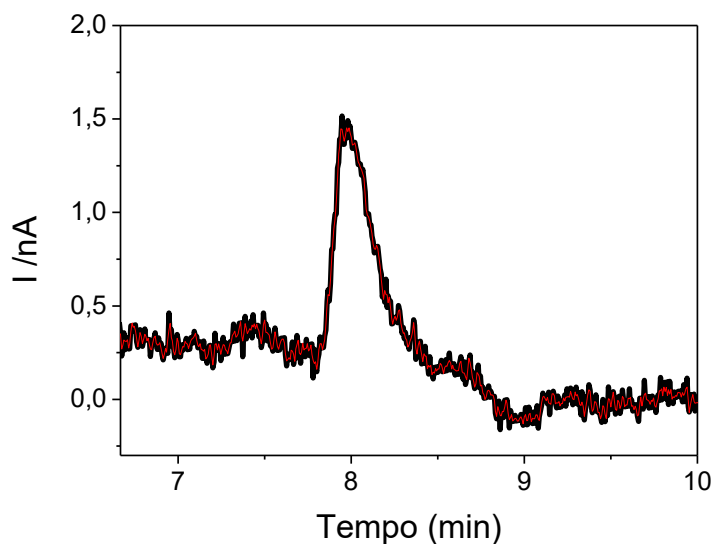


FIGURA 29: Cromatograma obtidos por detecção eletroquímica referente à determinação do limite de detecção do TBZ. Eletrólito suporte: fase móvel de tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0):ACN na proporção de 57:43 (V/V), volume de injeção de $20 \mu\text{L}$. $E = 1,35 \text{ V}$ x Ag/AgCl.

TABELA 9: LD e LQ relatados na literatura referentes à determinação de TBZ em várias matrizes, utilizando diferentes métodos de extração e análise.

Matriz	Método de extração	Método analítico	LD	LQ	Referência
Frutas e vegetais	SUSME	LC/Fluorescência	$0,4 \text{ g kg}^{-1}$	$1,3-1800 \text{ g kg}^{-1}$	MORAL et al., 2009
Água e solo	DLLME	CLAE/Fluorescência	$1,0 \text{ e } 1,6 \mu\text{g kg}^{-1}$	$2,0 \text{ e } 3,2 \mu\text{g L}^{-1}$	WU et al., 2009
Laranja, maçã,	-	Imunoensaio	$0,07 \text{ a } 0,10$	-	BLAZKOVÁ

banana e pera			$\mu\text{g L}^{-1}$		et al., 2010
Maçã	-	SERS-Au	$0,1 \text{ mg kg}^{-1}$	-	LUO et al., 2016
Maçã, tomates, alho-poró e água	-	VC e VPD (nanotubo de carbono)	$10 \mu\text{g L}^{-1}$	-	DONG et al., 2017
Casca de laranja e limão	MHFM-MIP	CLAE/UV	$4,0 \text{ e } 9,0 \mu\text{g kg}^{-1}$	-	DÍAZ-ÁLVAREZ et al., 2018
Suco de laranja	SPE	SERS	$4,0 \text{ mg L}^{-1}$	$13,0 \text{ mg L}^{-1}$	FENG et al., 2018
Suco de limão, cenoura e manga	-	SERS-AuNRs	$149 \text{ a } 216 \mu\text{g L}^{-1}$	-	ALSAMMAR RAIE et al., 2018
Maçã	-	SERS/GNR	$0,06 \text{ mg L}^{-1}$	$0,980 \text{ mg L}^{-1}$	FU et al., 2019
Laranja	SBSE	CLAE/UV	$0,10 \text{ mg kg}^{-1}$	$0,30 \text{ mg kg}^{-1}$	DÍAZ-ÁLVAREZ et al., 2019
Tomate	EPN	CLAE/EC	$5,5 \mu\text{g L}^{-1}$	$11 \mu\text{g L}^{-1}$	Este trabalho

Os dados mostrados na TABELA 9 indicam claramente uma variação muito grande nos valores de LD e LQ nos diferentes trabalhos da literatura e, portanto, mostram que esses valores são dependentes das diferentes técnicas de análise empregadas na detecção do TBZ. Entretanto, é necessário mencionar que todas as etapas do método desenvolvido neste trabalho foram realizadas em matriz orgânica (tomate), que apresentou sinal eletroquímico referente aos interferentes da matriz em todas as análises realizadas. Devido à complexidade da matriz estudada, os valores determinados de LD e LQ são considerados bons, confirmando a viabilidade do método desenvolvido.

Para avaliar a exatidão do método proposto foram realizados ensaios de recuperação intradia e interdía em triplicata para comparar os resultados alcançados com os valores de referência (Equação 3 - Seção 3.9). Para isso, utilizou-se do coeficiente de variação (CV%) para expressar a precisão do método (Equação 4 - Seção 3.9) e os valores obtidos estão apresentados na TABELA 10.

TABELA 10: Exatidão (%) e precisão (\pm %) intradia e interdia obtidos na determinação do TBZ em amostras de tomate na EPN em três níveis de concentração. Eletrólito suporte: fase móvel de tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7):ACN na proporção de 57:43 (V/V), volume de injeção de $20 \mu\text{L}$. $E = 1,35 \text{ V}$ x Ag/AgCl.

Amostra ($\mu\text{g/mL}$)	1º dia	2º dia	3º dia	Média (n = 9) Exatidão (%)
	Exatidão* (%)	Exatidão* (%)	Exatidão* (%)	
0,25	122 ± 12	110 ± 5	113 ± 12	115 ± 10
1,0	89 ± 25	80 ± 7	73 ± 11	81 ± 15
3,0	119 ± 8	89 ± 4	85 ± 16	98 ± 9

Pela análise da TABELA 10 é possível observar que o método apresentou boa exatidão para as amostras estudadas, com exceção para a análise da concentração de $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ do primeiro dia de ensaio, que mostrou porcentagem de recuperação pouco acima do valor aceitável. Os valores de recuperação média para os três dias de ensaio estiveram dentro dos valores sugeridos para análises de resíduos agrotóxicos. A precisão foi avaliada pelo coeficiente de variação (CV%) e confirmou boa precisão do método proposto.

Estudo de Interferente

O método proposto foi avaliado quanto à presença de um agrotóxico como interferente, o clopirifós (CPF). O CPF é um inseticida organofosforado que foi proibido no cultivo de tomate em 2004 pela ANVISA, sendo seu uso autorizado somente para tomate rasteiro, com fins industriais. Entretanto, seu uso ainda tem sido comprovado nas lavouras de tomate de mesa do Brasil, tal como descrito anteriormente. A FIGURA 30 mostra o resultado dessa medida.

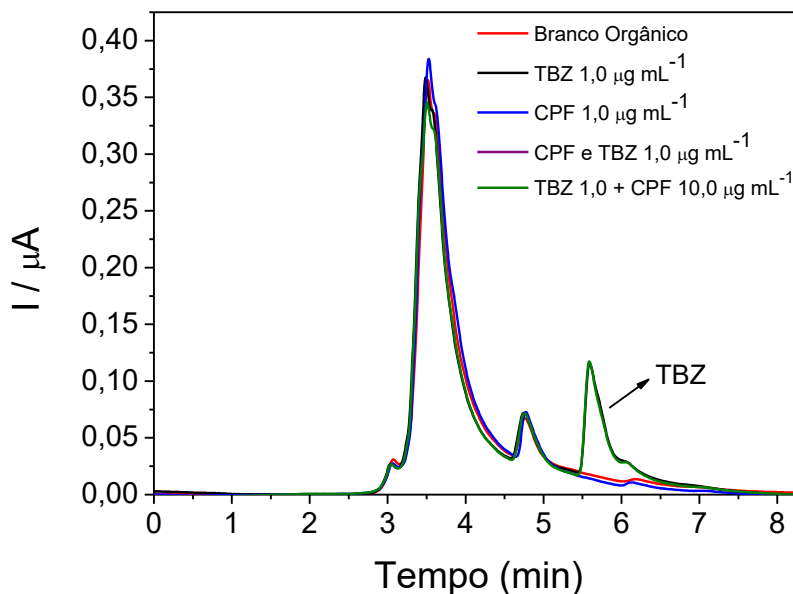


FIGURA 30: Cromatogramas obtidos por detecção eletroquímica referente à EPN em condição otimizada em tomate orgânico (pH 7). Eletrólito suporte: fase móvel de tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7):ACN na proporção de 57:43 (V/V), volume de injeção de $20 \mu\text{L}$. $E = 1,35 \text{ V x Ag/AgCl}$.

A FIGURA 30 mostra os cromatogramas obtidos para uma amostra sem adição de qualquer fungicida (branco), somente com CPF, com a adição de TBZ e CPF na mesma concentração e por último somente com a adição de CPF em concentração dez vezes maior que TBZ. Os cromatogramas demonstram claramente que o agrotóxico CPF, além de não apresentar sinal eletroquímico, não interfere nas medidas realizadas para determinação de TBZ, o que confirma a não interferência deste fungicida no método.

Para confirmação do sinal analítico do CPF, foi necessário dopar a mesma amostra de tomate que foi realizada nos experimentos mostrados na FIGURA 30, com uma quantidade muito grande do agrotóxico. A FIGURA 31 mostra o resultado desta medida a partir do cromatograma obtido por detecção UV.

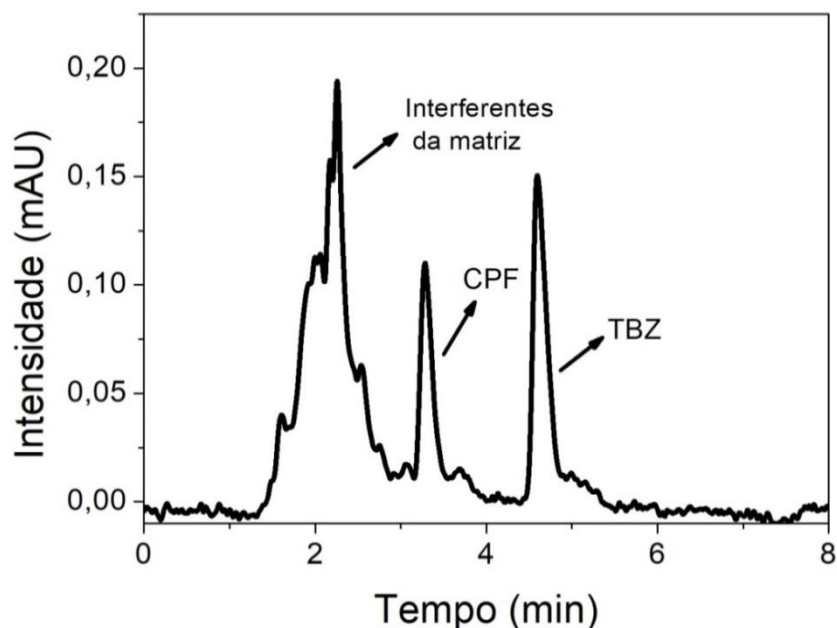


FIGURA 31: Cromatograma obtido por CLAE-UV referente à EPN em condição otimizada em tomate orgânico (pH 7) adicionando $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de TBZ e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CPF. Fase móvel tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7):ACN na proporção de 57:43 (V/V), volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ e $\lambda = 274 \text{ nm}$.

De acordo com o cromatograma mostrado na FIGURA 31, os picos de retenção referentes ao CPF e TBZ aparecem em 3,3 min e 4,6 min, respectivamente. Para que fosse possível visualizar o sinal do CPF por CLAE/UV nas condições do método proposto, foi necessário dopar a amostra da EPN com uma quantidade cem vezes maior do agrotóxico interferente. Nesta condição, o CPF não apresentou nenhum sinal eletroquímico e, portanto, sua atividade eletroquímica parece ser muito pequena ou até mesmo nula.

Aplicação do método (CLAE/EC) para determinação de TBZ em tomates

Depois de validado, o método CLAE/EC foi aplicado na análise de amostras comerciais de tomate de três estabelecimentos na cidade de Catalão-GO. As amostras foram obtidas de fornecedores locais distintos e denominadas de Comercial 01, 02, e 03. As FIGURAS 32-35 mostram os resultados obtidos para cada amostra de tomate comercial.

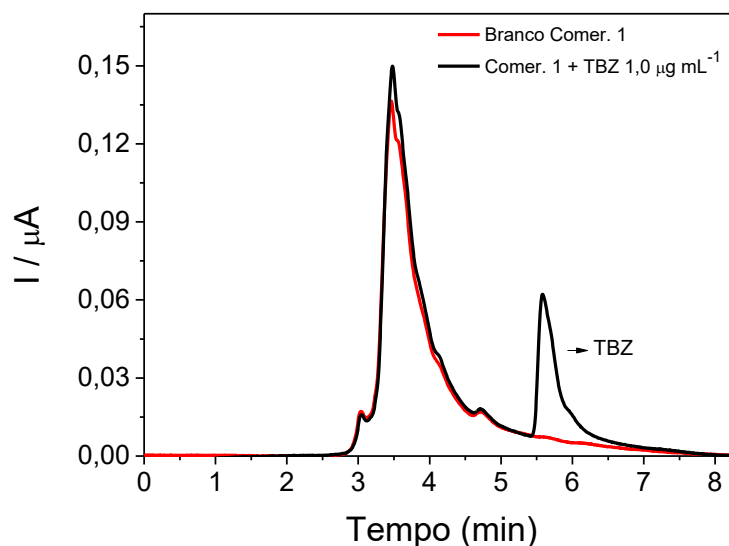


FIGURA 32: Cromatogramas obtidos por detecção eletroquímica referente à EPN em condição otimizada para o tomate Comercial 01 (pH 7) adicionando 25 μL de solução padrão de TBZ $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (—) e seu respectivo branco (—). Eletrólito suporte: fase móvel tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7):ACN na proporção de 57/43 (V/V), volume de injeção de 20 μL . $E = 1,35 \text{ V x Ag/AgCl}$.

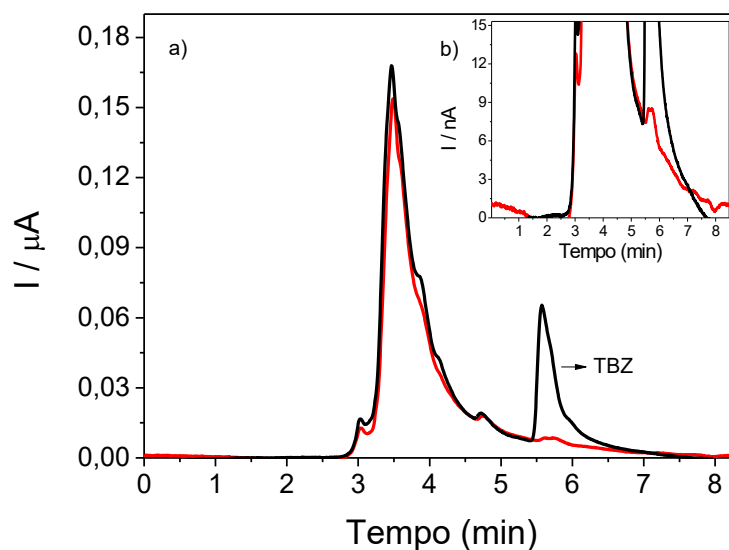


FIGURA 33: (a) Cromatogramas obtidos por detecção eletroquímica referente à EPN em condição otimizada em tomate comercial 02 (pH 7) adicionando 25 μL de solução padrão de TBZ $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (—) e seu respectivo branco (—). Eletrólito suporte: fase móvel tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7):ACN na proporção de 57/43 (V/V), volume de injeção de 20 μL . $E = 1,35 \text{ V x Ag/AgCl}$. (b) Região ampliada onde se encontra o sinal analítico do TBZ na amostra do branco.

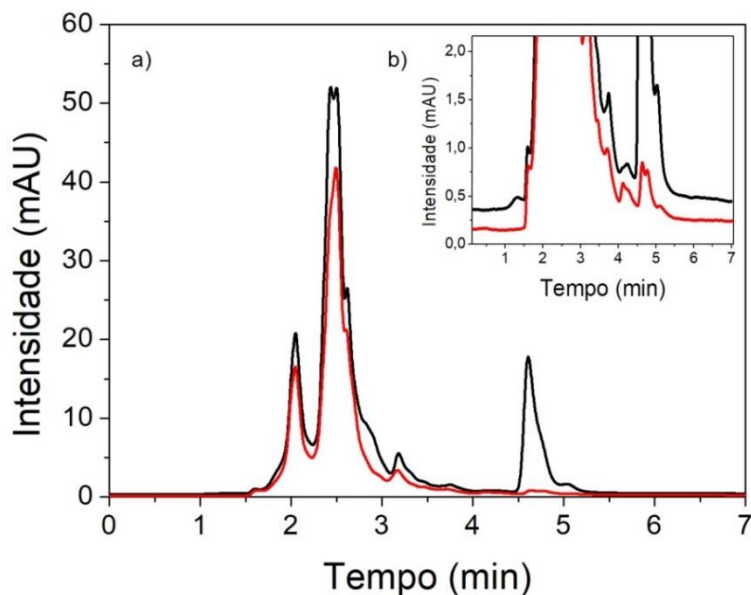


FIGURA 34: (a) Cromatogramas obtidos por CLAE-UV referente à EPN em condição otimizada em tomate comercial 02 (pH 7) adicionando 25 μL de solução padrão de TBZ $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (—) e seu respectivo branco (—). Eletrólito suporte: fase móvel tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7):ACN na proporção de 57/43 (V/V), volume de injeção de 20 μL . $E = 1,35 \text{ V x Ag/AgCl}$. (b) Região ampliada onde se encontra o sinal analítico do TBZ na amostra do branco.

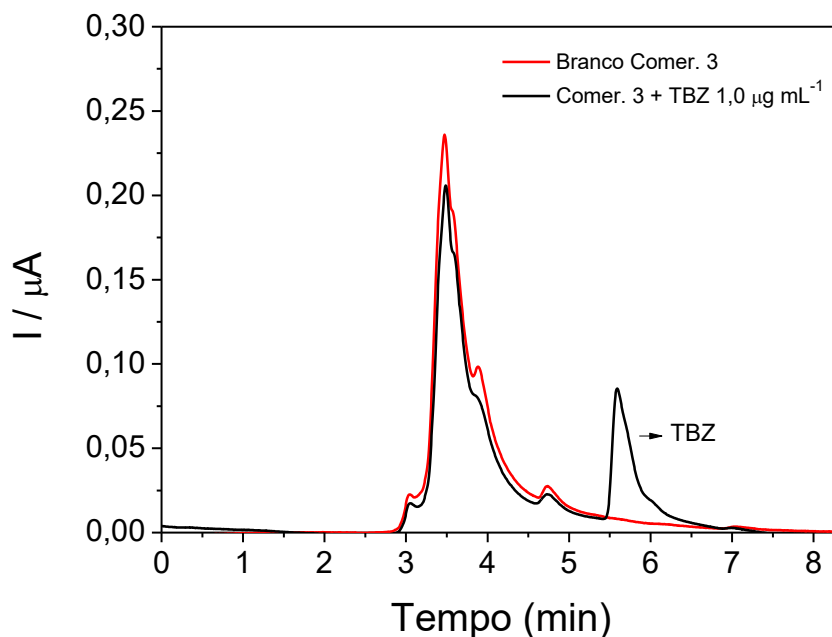


FIGURA 35: Cromatogramas obtidos por detecção eletroquímica referente à EPN em condição otimizada em tomate comercial 03 (pH 7) adicionando 25 μL de solução padrão de TBZ $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (—) e seu respectivo branco (—). Eletrólito suporte: fase móvel tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7):ACN na proporção de 57/43 (V/V), volume de injeção de 20 μL . $E = 1,35 \text{ V x Ag/AgCl}$.

Tal como verificado na FIGURA 32, a amostra de tomate Comercial 01 não continha nenhum traço de TBZ. Já na amostra de tomate Comercial 02 é possível observar um sinal analítico do TBZ no branco da amostra (FIGURA 33a). A ampliação da região do pico mostrada na FIGURA 33 (inserida) possibilitou visualizar mais claramente o sinal analítico do TBZ na amostra do branco, o qual também foi confirmado pela detecção por UV (FIGURA 34). Por último, a FIGURA 35 confirma que a amostra de tomate Comercial 03 não apresentou TBZ em sua composição (branco).

Portanto, de acordo com a aplicação do método desenvolvido em tomates comerciais foi possível identificar que uma das amostras estava contaminada com TBZ. Utilizando a equação da reta da curva analítica sem extração, e o sinal de corrente do TBZ obtido (FIGURA 33), foi possível determinar a concentração presente na amostra de tomate Comercial 2, a qual era de $0,178 \text{ mg L}^{-1}$ ($8,85 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$). A determinação dessa quantidade de TBZ presente na amostra é válida, pois a concentração encontrada estava acima do LQ da metodologia desenvolvida. É importante ressaltar que a presença de TBZ em amostras de tomates é considerada irregular, dado que o fungicida TBZ é apenas autorizado para aplicação em sementes da planta, e, portanto, não deveria ser encontrada nos frutos (ANVISA, 2016).

Finalizada a otimização do processo de EPN bem como a validação e aplicação do método por CLAE/EC, um método para determinação eletroquímica do TBZ extraído de tomate por EPN foi desenvolvido para análises em batelada por VPD, também empregando eletrodo de DDB. Toda a descrição deste método encontra-se discutida a seguir.

4.4.2 VPD

De acordo com as informações descritas anteriormente, a condição de pH 2 foi a que apresentou maior intensidade de sinal de corrente (I_{p_a}) para oxidação do TBZ. Assim, a obtenção das melhores condições para aplicação do método por VPD foram realizadas nesta condição de pH.

Na VPD, parâmetros tais como a amplitude e escada de potencial devem ser cuidadosamente otimizados para que a técnica gere resultados com maior eficiência. Nesse sentido, a FIGURA 36 mostra os voltamogramas de pulso diferencial obtidos na otimização do parâmetro amplitude. Para isso, os valores do tempo de intervalo entre cada pulso e da

escada de potencial foram fixados em 0,1 s e 5,0 mV, respectivamente, enquanto a amplitude foi variada de 10 mV a 100 mV.

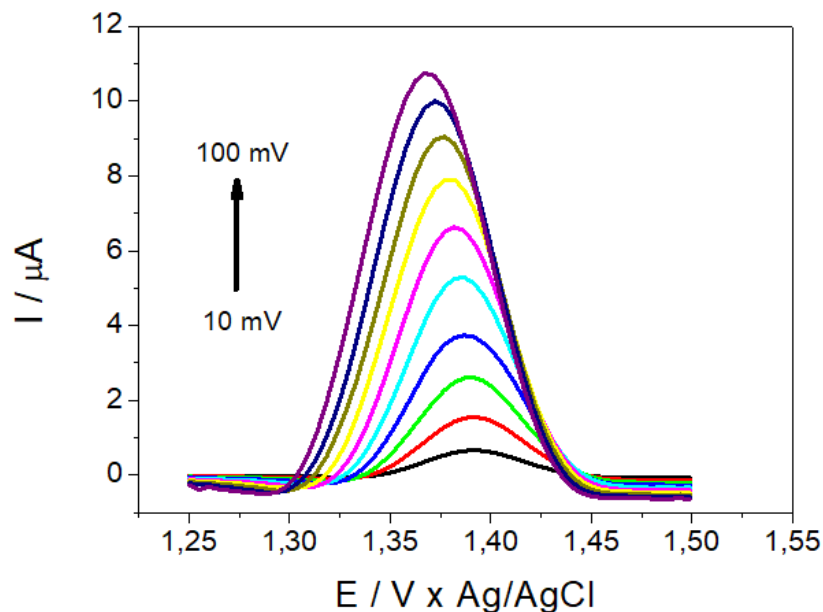


FIGURA 36: Voltamogramas de pulso diferencial com variação de amplitude de 10 mV a 100 mV obtidos para TBZ na concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0). Escada de potencial de 5 mV, tempo de intervalo de pulso de 0,1 s. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Verifica-se no voltamograma da FIGURA 36, um aumento da corrente de pico com o aumento da amplitude, o que denota um aumento na sensibilidade do método, tal como esperado. Entretanto, o aumento da amplitude também leva a um aumento na largura do pico, o que diminui sua resolução. Além disso, é observado um leve deslocamento do potencial de pico para valores menos positivos com o aumento da amplitude, provavelmente decorrente da maior facilidade de ocorrência do processo de oxidação para maiores amplitudes. Portanto, os dados voltamétricos mostram que a condição de amplitude de potencial onde se obtém maior sensibilidade sem perda da resolução do sinal analítico, se dá em 60 mV, sendo este valor considerado como a condição mais adequada para estas análises.

Após a obtenção da melhor condição do parâmetro amplitude, o parâmetro voltamétrico de escada de potencial foi avaliado fixando-se a amplitude na melhor condição (60 mV) e o tempo de intervalo entre cada pulso (0,1 s), e variando-se os valores de escada de potencial de 1 mV a 10 mV. A FIGURA 37 mostra os resultados dessa medida.

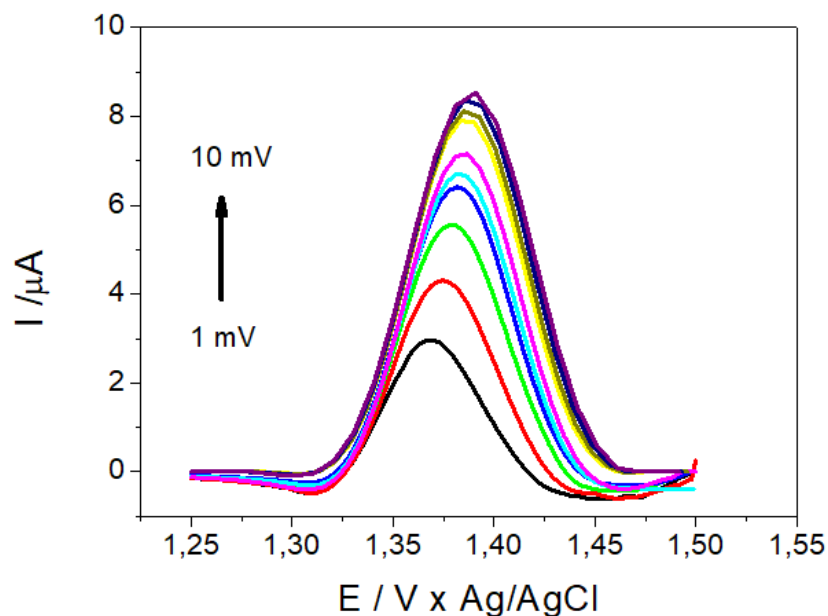


FIGURA 37: Voltamogramas de pulso diferencial com variação da escada de potencial entre 1 mV a 10 mV (ou 10 mV s^{-1} a 100 mV s^{-1}) para TBZ $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0). $a = 60 \text{ mV}$ e tempo de intervalo de pulso de 0,1 s.

De acordo com a FIGURA 37 pode-se observar um leve deslocamento do potencial de pico para valores mais positivos com o aumento da escada de potencial, além do aumento da corrente de pico. Na verdade, como o aumento da escada de potencial resulta no aumento da velocidade de varredura (o tempo de intervalo é fixo), o deslocamento de potencial observado deve ocorrer em função de que quanto maiores são as velocidades de varredura de potencial, maiores também serão as taxas de transferência eletrônica, as quais tendem a ficar cada vez mais difíceis de serem mantidas pelo eletrodo à medida que a velocidade de varredura aumenta. Dessa forma, considerando-se um balanço entre o sinal analítico (corrente) e a largura de pico (resolução), o valor de 7 mV (correspondente a uma velocidade de varredura de potencial de 70 mV s^{-1}) foi escolhido como a melhor condição de escada de potencial. Como a varredura de potencial destas medições compreende em torno de 500 mV, o tempo gasto em cada medida é de somente 7 s, o que é extremamente relevante do ponto de vista de frequência analítica.

Com as melhores condições definidas para a VPD, foi realizado o teste de repetitividade, para verificar se a análise possui variabilidade aceitável. As melhores

condições de VPD encontradas foram com o uso de amplitude de 60 mV e escada de potencial de 7 mV (velocidade de varredura 70 mV s^{-1}). Assim, análises foram realizadas nas mesmas condições para visualização do comportamento do analito frente a uma série de medidas sucessivas (repetitividade), as quais estão mostradas na FIGURA 38.

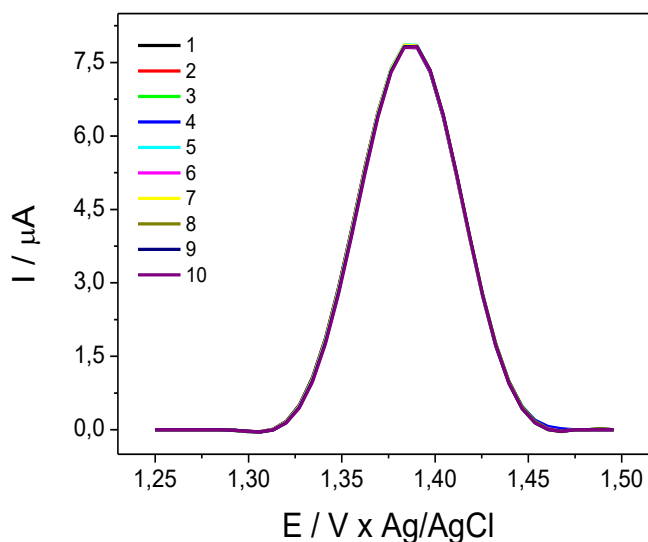


FIGURA 38: Voltamogramas de pulso diferencial obtido no teste de repetitividade. TBZ ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2). $a =$ de 60 mV, escada de potencial de 7 mV ($v = 70 \text{ mV s}^{-1}$).

De acordo com os resultados mostrados na FIGURA 38, para as 10 medidas obteve-se um valor médio de $7,80 \pm 0,02 \text{ } \mu\text{A}$, com 1,43% de desvio padrão relativo. Utilizando-se o Teste *t*-Student ($n = 10$ e 9 graus de liberdade) o valor de t_{cal} (calculado) foi de 0,0143, bem abaixo do valor do t_{crit} (crítico) de 2,262 para um intervalo de confiança de 95%.

O limite de detecção (LD) para o fungicida TBZ foi obtido considerando-se a concentração correspondente ao sinal de detecção pelo menos três vezes maior que o sinal do ruído. Já o limite de quantificação (LQ) para o fungicida TBZ foi obtido considerando-se os menores sinais de pico de corrente registrado com possibilidade de serem quantificados com reprodutibilidade de pelo menos 75%. Os LD e LQ obtidos para a determinação eletroquímica de TBZ por VPD foram de $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e $3,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, bem superiores aos obtidos por amperometria (CLAE/EC) no qual a difusão é favorecida pela presença de fluxo. A FIGURA 39 mostra os VPD obtidos nas concentrações de LD e LQ na determinação eletroquímica do fungicida TBZ e a FIGURA

40 apresenta a curva analítica bem como a correlação linear entre I_{pa} e concentração de TBZ.

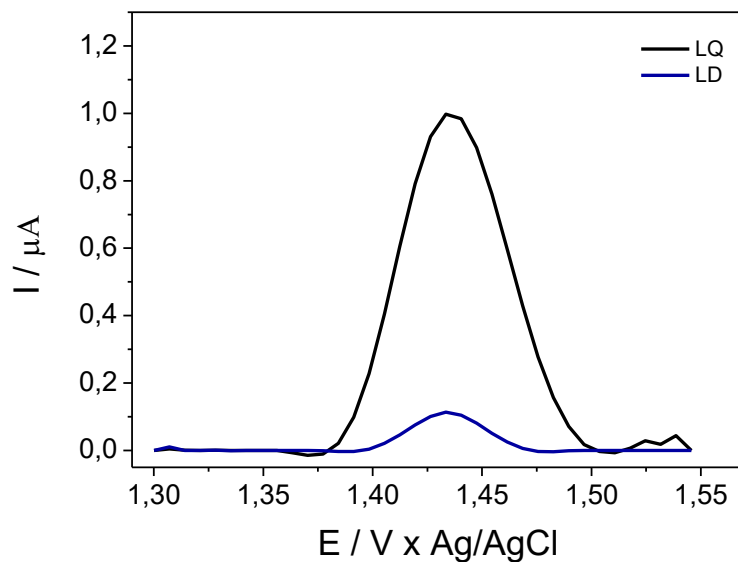


FIGURA 39: Voltamogramas obtidos por VPD referentes à determinação do LD e LQ para a determinação do TBZ. Eletrólito suporte: tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2). $a = 60 \text{ mV}$, escada de potencial de 7 mV ($v = 70 \text{ mV s}^{-1}$).

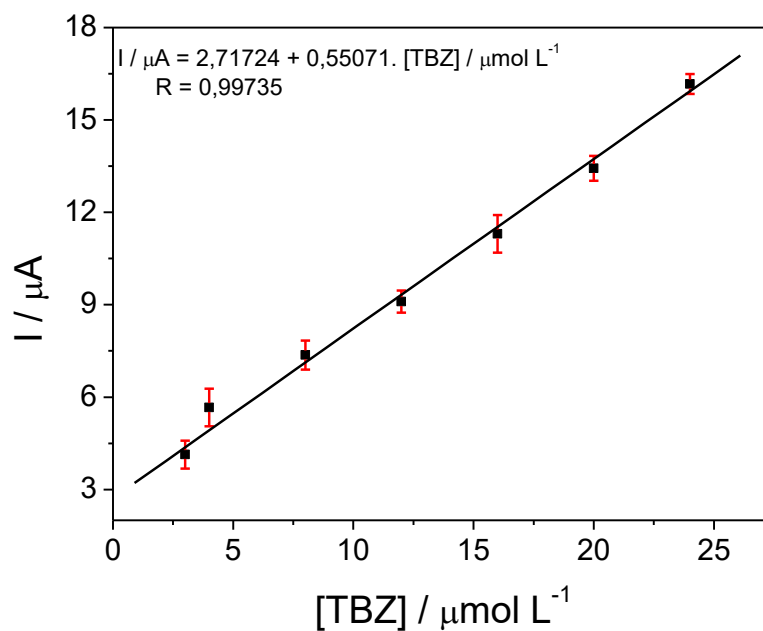


FIGURA 40: Curva analítica obtida em condição otimizada da VPD para determinação de TBZ em meio de tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2). $a = 60 \text{ mV}$, escada de potencial de 7 mV ($v = 70 \text{ mV s}^{-1}$).

A FIGURA 39 mostra que os voltamogramas obtidos na determinação do LD e LQ apresentam-se com boa resolução para determinações analíticas. Além disso, a curva analítica mostrada na FIGURA 40 mostra que o método satisfaz o critério de linearidade ($R^2 = 0,997$).

Aplicação do método (VPD) para determinação de TBZ em tomates

O método de VPD desenvolvido foi avaliado na determinação de TBZ em tomate visando aplicação prática e aumento da frequência analítica. Neste estudo, uma célula eletroquímica convencional e de volume reduzido foi utilizada em função dos pequenos volumes de amostra disponíveis após o processo de EPN. Para isso, volumes de 100 μL de amostra de TBZ extraída por EPN foram adicionados à célula eletroquímica contendo 5 mL de tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} em pH 2. A FIGURA 41 mostra o voltamograma obtido nesta medida.

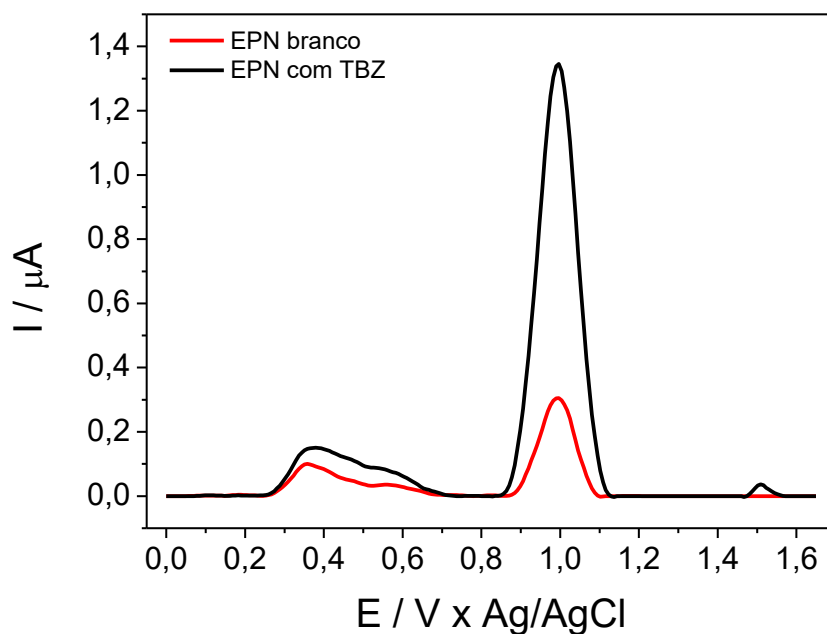


FIGURA 41: Voltamograma de pulso diferencial para TBZ em meio de tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} (pH 2) obtidos após procedimento de EPN em tomate orgânico (—) e obtidos após procedimento de EPN em tomate orgânico com adição de TBZ (—) (C_{ad} de 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). $a = 60 \text{ mV}$, escada de potencial de 7 mV ($v = 70 \text{ mV s}^{-1}$).

A FIGURA 41 em vermelho mostra a extração por ponto nuvem em tomate orgânico (branco) que possui sinais referentes aos interferentes da matriz entre 0,2 V e 1,2 V. Em preto a mesma amostra foi dopada com $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de solução padrão de TBZ ($2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) antes de ser submetida à EPN, e os mesmos sinais referentes aos interferentes da matriz foram observados, além da presença de um terceiro pico em aproximadamente 1,5 V, possivelmente decorrente da presença de sinal eletroquímico referente à oxidação do TBZ obtido após a EPN.

Sabendo-se que a concentração de TBZ presente na fase rica do surfactante após a EPN pode ser estimada pelo produto $C_{\text{ad}} \times F_C$, a concentração de TBZ prevista deveria ser de $11,4 \text{ mg L}^{-1}$ (ou $5,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Assim, a adição de $100 \mu\text{L}$ da fase rica do surfactante (onde o TBZ está presente) aos $5,0 \text{ mL}$ ($5000 \mu\text{L}$) de eletrólito suporte existentes na célula resulta na diluição do analito em 50 vezes. Em outras palavras, como a concentração de TBZ analisada nesta condição é estimada ser de $1,14 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, a presença de TBZ deveria ser, de fato, detectada nesta medida, pois está dentro da faixa de LD prevista pela técnica ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$).

Para confirmar que o aparecimento do pico em $\sim 1,5 \text{ V}$ era, de fato, referente ao TBZ, foram adicionadas alíquotas adicionais da amostra extraída por ponto nuvem na mesma célula eletroquímica. Os resultados dessa medida (FIGURA 42) mostraram que o pico em questão era, de fato, referente ao TBZ dado o aumento do sinal obtido na mesma região.

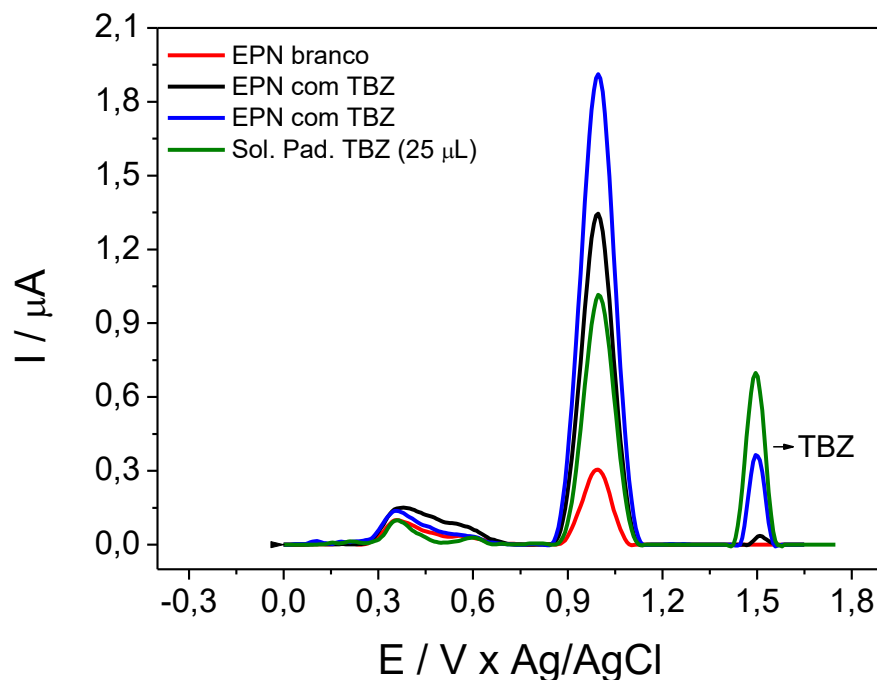


FIGURA 42: Voltamogramas de pulso diferencial para TBZ em meio de tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2) obtidos após procedimento de EPN em tomate (C_{ad} de $2,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) e extração fortificada com solução padrão de TBZ. $a = 60 \text{ mV}$, escada de potencial de 7 mV ($v = 70 \text{ mV s}^{-1}$).

Dessa forma, os resultados obtidos por VPD mostraram que esta técnica é capaz de determinar TBZ extraído e pré-concentrado pela técnica de ponto nuvem de amostra de tomate sem nenhuma interferência dos elementos presentes na matriz. Além disso, apesar dos maiores LD e LQ obtidos, a técnica de VPD proporcionou um aumento de frequência analítica em aproximadamente 90 vezes em comparação à técnica de CLAE/EC, o que também demonstra ser um resultado bastante relevante e significativo do ponto de vista de aplicabilidade e rotina analítica.

5 CONCLUSÃO

Os estudos de caracterização eletroquímica do TBZ sobre eletrodo de DDB foram devidamente realizados e mostraram que o pH do meio tem um papel importante na detecção eletroquímica do fungicida. Ainda que maiores sinais de corrente possam ser comprovadamente obtidos em condições de pH mais baixos, a instrumentação utilizada na determinação de TBZ em tomates (CLAE) requer o uso de condições analíticas mais amenas para o equipamento.

A metodologia desenvolvida para extração e pré-concentração de TBZ por ponto nuvem utilizando o surfactante não iônico Tergitol TMN-6, e detecção por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector eletroquímico (CLAE/EC), apresentou-se como um método eficiente para extração, pré-concentração (6 vezes), detecção e quantificação de baixas concentrações do fungicida TBZ em amostra de tomate. A utilização do planejamento fatorial proporcionou encontrar a melhor condição para EPN utilizando uma quantidade menor de experimentos, e que resultou na diminuição de tempo e temperatura de análise. Além disso, a aplicação do método desenvolvido na determinação de TBZ em amostras de tomates comerciais demonstrou que uma das amostras analisadas estava contaminada com TBZ, confirmando a eficiência do método proposto.

Um segundo método para determinação eletroanalítica do fungicida TBZ em frutos de tomate usando eletrodo de DDB a partir da EPN e da VPD como técnica de detecção foi também desenvolvido e aplicado com a finalidade de aumentar a frequência analítica e tornar o método mais simples. Um aumento de aproximadamente 90 vezes na frequência analítica foi atingido pelo uso da técnica de VPD em comparação à técnica de CLAE/EC.

Portanto, considera-se que o trabalho de pesquisa desenvolvido alcançou seu objetivo em desenvolver e validar um procedimento para determinação eletroanalítica do fungicida TBZ em frutos de tomate usando eletrodo de DDB a partir da extração e pré-concentração pelo uso da técnica de ponto nuvem utilizando surfactante não iônico Tergitol-TM6.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRASCO: **Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde** / Organização de Fernando, F, C; Lia; G, S; Raquel, M, R; Karen, F; e André, C, B. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em 29 mai. 2018.

ALVES, M. R. R; TORRES, M. C. L; SOARES, N. F. F; MELO, N. R; GERALDINE, R. M; MIZUBUTI, E. S. G; SILVEIRA, M. F. A. Efeito de soluções de enxágue na remoção de resíduos de mancoeb em tomates de mesa. **Pesq. Agropec. Trop.** Goiânia, v. 20, n. 1, p. 96-101, 2010.

ALSAMMARRAIEA, F. K; LINA, M; MUSTAPHA, A; LINB, H; CHENB, X CHENB, Y; WANGB, H; HUANG, M. Rapid determination of thiabendazole in juice by SERS coupled with novel gold nanosubstrates. **Food Chemistry**, v. 259, p. 219-225, 2018.

AMIN, H. M.A; UCHIDA, Y; BATCHELOR-MCAULEY, C; KÄTELHÖN, E; G. COMPTON, R. G. Non-triangular potential sweep cyclic voltammetry of reversible electron transfer: Experiment meets theory. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 815, p. 24-29, 2018.

AMORELLO, D; ORECCHIO, S. Micro-determination of dithiocarbamates in pesticide formulations using voltammetry. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 334–339, 2013.

ANDRADE, G. C. R. M.; MONTEIRO, S. H.; FRANCISCO, J. G.; FIGUEIREDO, L. A.; BOTELHO, R. G.; TORNISIELO, V.L. Liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry and dynamic multiple reaction monitoring method for determining multiple pesticide residues in tomato. **Food Chemistry**, v. 175, p. 57-65, 2015.

ANDRADE, L. S.; 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, n. 2, p.127-132, 2009.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografias Autorizadas. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/T12%2B%2BTiabendazol.pdf/f36e77e0-2515-4d1a-bfdc-b285ed739ccd>> Acesso em 23 mai. 2018.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA)**: Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015. Brasília, DF. p. 93, 2016.

ASSIS, A. P.; OKUMURA, L. L.; SACZKB, A. A.; OLIVEIRA, M. F. New Voltammetry-Based Technique for the Determination of Tebuthiuron in Crystal and Brown Sugar Samples. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 25, n. 1, p. 25-27, 2014.

BAI, D.; LI, J.; CHEN, S. B.; CHEN, B. H. A Novel Cloud-Point Extraction Process for Preconcentrating Selected Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Aqueous Solution. **Environ. Sci. Technol.**, v. 35, p. 3936-3940, 2001.

BARROS NETO, B de.; SCARMINIO, I, S.; BRUNS, R, E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. p. 99, 100.

BARROS, R. de C. M. de; RIBEIRO, M. C.; NA-SUMODJO, P. T.; JULIÃO, M. S. da S.; SERRANO, S. H. P.; FERREIRA, N. G. Filmes de diamante CVD dopado com boro. Parte I. Histórico, produção e caracterização. **Quim. Nova**, v. 28, nº 2, p. 317-325, 2005.

BELGHITI, D. K.; ZADEH-HABCHI, M.; SCORSONE, E.; BERGONZO, P. Boron doped diamond/metal nanoparticle catalysts hybrid electrode array for the detection of pesticides in tap water. **Procedia Engineering**, v. 168, p. 428-431, 2016.

BEZERRA, M. de A.; ARRUDA, M. A. Z.; FERREIRA, S. L. C. Cloud Point Extraction as a Procedure of Separation and Pre-Concentration for Metal Determination Using Spectroanalytical Techniques: A Review. **Appl. Spectrosc. Rev.**, v. 40, p. 269-299, 2005.

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

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de experimentos usando o Statistica.** E-Papers Serviços Editoriais, Rio de Janeiro, 2003. p.76, 77, 120.

CARDOSO, M. H. W.M.; GOUVÊA, A. V.; NÓBREGA, A. W; ABRANTES, S. M. P. Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: uma experiência laboratorial. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 30, p. 63-72, 2010.

CARVALHO, A. E. **Caracterização eletroquímica de eletrodos de diamante dopado com boro em função de seu pré-tratamento.** 2007. 5 f. Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

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 Anal. Methods.**, v. 6, p. 28-35, 2012.

COSTA, B. E. S. **Extração Seletiva por Ponto Nuvem Para Pré-Concentração e Especificação de Arsênio Inorgânico em Matriz Alimentícia Empregando**

Espectrometria de Absorção Atômica Eletrotérmica em Forno de Grafite. Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química - UFG, 2013. Dissertação de mestrado, 103 p.

COSTA, D. J. E.; SANTOS, J.C.S.; SANCHES-BRANDÃO, F. A. C; RIBEIRO, W. F; SALAZAR-BANDA, G. R; ARAUJO, M. C. U. Boron-doped diamond electrode acting as a voltammetric sensor for the detection of methomyl pesticide. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.789, p. 100-107, 2017.

DE AMORIM, K. P.; ANDRADE, L. S. Development and application of a cloud point method for the extraction of natural estrogens E1 and E2 from urine samples and their simultaneous determination by HPLC-EC using a BDD electrode. **Analytical Method**, v. 9, p. 1627-1633, 2017.

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.** Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química - UFG, 2015. Dissertação de mestrado, 37 p.

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.

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.

DOS SANTOS, W. T. P; AZEVEDO, E. F; RICHTER, E. M; ALBUQUERQUE, Y. D. T. Construção e caracterização de um detector eletroquímico para análises em fluxo. **Quim. Nova**, v. 32, n. 9, p. 2412-2416, 2009.

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.

ESCALEIRA, L. A. **Extração e pré-concentração do ponto nuvem para a determinação de metais em águas salinas por espectrometria de emissão ótica com fonte de plasma indutivamente acoplado.** Niterói, Universidade Federal Fluminense – UFF, 2005. Dissertação de mestrado, 101 p.

FARIA, A. M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A. Extração por ponto nuvem: técnica alternativa para a extração de resíduos de agrotóxicos. **Pesticidas: r.ecotoxicol. e meio ambiente**, Curitiba, v. 15, p. 29-42, 2005.

FERRERA, Z. S.; SANZ, C. P.; SANTANA, C. M.; RODRIGUEZ, J. J. S. The use of micellar systems in the extraction and pre-concentration of organic pollutants in environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, p. 469-479, 2004.

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, 2018.

FONSECA, I.; PROENÇA, L.; CAPELO, S. A voltametria cíclica e de varrimento linear unidirecional: suas potencialidades na caraterização de processos de corrosão. **Corros. Prot. Mater.** v. 34, n. 1, p. 12-21, 2015.

FRANÇA, R. F.; OLIVEIRA, H. P. M.; PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L. Electroanalytical determination of carbendazim and fenamiphos in natural waters using a diamond electrode. **Diamond & Related Materials**, v. 27-28, p. 54-59, 2012.

FREITAS, S. S. **Desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação multiresíduo de pesticidas em frutas brasileiras**. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2005. Tese de doutorado, 181 p.

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.

GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p.105-112, 2006.

GARP - Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas. **Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos**. São Paulo: GARP, 1999.

HAGE, D. S.; CARR, J. D. Química analítica e análise quantitativa. **Person Prentice Hall**, 1 ed. p. 397, São Paulo, 2012.

HARRIS, D. C. **Química analítica qualitativa**. 4. ed. Rio de Janeiro, 2012

HALKO, R.; SANZ, C. P.; FERRERA, Z. S.; RODRIGUEZ, J. J. S. Determination of benzimidazole fungicides by HPLC with fluorescence detection after micellar extraction. **Chromatographia**, v. 60, p. 151-156, 2004.

HENEBERGA, P.; SVOBODAB, J.; PAVEL PECH, P. Benzimidazole fungicides are detrimental to common farmland ants. **Biological Conservation**, v. 221, p.114–117, 2018.

HUPERT, M.; MUCK, A.; WANG, J.; STOTTER, J.; CVACKOVA, Z.; HAYMOND, S.; SHOW, Y.; SWAIN, G. M. Conductive diamond thin-films in electrochemistry. **Diamond and Related Materials**, v. 12, p.1940–1949, 2003.

IBAMA. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/phocadownload/qualidadeambiental/relatorios/2016/grafico-consumo-agrotoxicos-2000-2016.pdf>> Acesso em 18 abr. 2018.

INMETRO. **DOQ-CGCRE-008 - Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Revisão 05. INMETRO/DICLA, 2016.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J.A.; QUEIROZ, S.C.N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. **Quim. Nova**, v.32, n.4, p. 996-1012, 2009.¹

JIA, G.; LV, C.; ZHU, W.; QIU, J.; WANG, X.; ZHOU, Z. Applicability of cloud point extraction coupled with microwave-assisted back-extraction to the determination of organophosphorous pesticides in human urine by gas chromatography with flame photometry detection. **Journal of Hazardous Materials**, v. 159, p. 300–305, 2008.

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.

KOUKOUVINOS, G.; TSIALLAA, Z.; PETROUA, P. S.; MISIAKOS, K.; GOUSTOURIDIS, D.; MORENOE, A. U.; FERNANDEZ-ALBA, A. R.; RAPTIS, I.; KAKABAKOS, S. E. Fast simultaneous detection of three pesticides by a White Light Reflectance Spectroscopy sensing platform. **Sensors and Actuators B**, v. 238, p. 1214-1223, 2017.

LATORRACA, A.; MARQUES, G. J. G.; SOUSA, K. V.; FORNÉS, N. S. Agrotóxicos na produção de tomate, resíduos e saúde humana. **Com. Ciências Saúde**, v. 19, n. 4, p.365-374, 2008.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 4. ed. Campinas: Editora Átomo, 2002. 36p.

LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C. C. “Green chemistry” – os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Quim. Nova**, v. 26, n. 1, 123-129, 2003.

LI, C. F.; WONG, J. W. C.; HUIEA, C. W.; CHOI, M. M. F. On-line flow injection-cloud point preconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons coupled with high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1214, p. 11–16, 2008.

LI, J.; MA, X.; ZHANG, M.; LI, D.; YUAN, Y.; FAN, Y.; XIE, X.; GUO, L.; ZENG, G. Preparation of Molecularly Imprinted Polymer Sensor on Electrochemically Reduced

Graphene Oxide Modified Electrode for Selective Probing of Thiabendazole. **Journal of The Electrochemical Society**, v.166, p. B84-B91, 2019.

LIU, C.; JIN, W.; YANG, Y. High-performance liquid chromatography determination of antioxidants in cosmetics after cloud point extraction using dodecylpolyoxyethylene ether. **Anal. Methods**, v. 6, p. 6038-6043, 2014.

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

LUO, H.; HUANG, Y.; LAI, K.; RASCO, B. A.; B, FAN, Y. Surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with gold nanoparticles for rapid detection of phosmet and thiabendazole residues in apples. **Food Control**, v. 68, p. 229-235, 2016.

MAHÉ, E.; DEVILLIERS, D.; DARDOIZE, F. Boron doped diamond microelectrodes arrays for electrochemical detection in HPLC. **Talanta**, v.132, p. 641–647, 2015.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.

MARTÍNEZ, R. C.; GONZALO, E. R.; JIMÉNEZ, M. G. G.; PINTO, C. G.; PAVÓN, J. L. P.; MÉNDEZ, J. H. Determination of the fungicides folpet, captan and captafol by cloud-point preconcentration and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **J. Chromatogr. A**, v. 754, p. 85-96, 1996.

MARTINS, I. M.; RODRIGUES, S. N.; BARREIRO, M. F.; RODRIGUES, A. E. Polylactide-Based Thyme Oil Microcapsules Production: Evaluation of Surfactants. **Ind. Eng. Chem. Res.** V. 50, p. 898–904, 2011.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE: Disponível em: <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos> Acesso em 23 de mai. 2018.

MIRANDA, L.; FELSNER, M. L.; TORRES, Y. T.; HOSS, I.; GALLI, A.; QUINÁIA, S. P. Validação intralaboratorial da determinação de metiltestosterona em águas naturais por voltametria usando eletrodo de gota pendente de mercúrio. **Quim. Nova**, v. 38, p.419-426, 2015.

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.

MOURA; A. P.; FILHO, M. M.; GUIMARÃES, J. A.; LIZ, R. S. Manejo integrado de pragas do tomateiro para processamento industrial. Brasília, DF: **Embrapa Hortaliças** (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 129), 2014. p.17.

OLIVEIRA, J. J. V.; TOLEDO, M. C. F. Resíduos dos fungicidas tiabendazol e imazalil em laranjas pêra (*citrus sinensis (l.) Osbeck cv. Pêra*). **Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meia ambiente**, v. 9, 1999.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Rev. Virtual Quim.**, v. 5, p. 516-537, 2013.

POURREZA, N.; SHARIFI, H.; GOLMOHAMMADI, H. Curcumin nanoparticles combined with cloud point extraction for citrate determination in food and drug samples. **Microchemical Journal**, v. 129, p. 213-218, 2016.

PRAK, D. J.; WADDLE, A. N. Solubilization of Nitroaromatic Compounds from MultiComponent Mixtures into Nonionic Surfactant Micellar Solutions. **Separation Science and Technology**, v. 45, p. 732–739, 2010.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 771 - 780, 2004.

RIBEIRO, F. W. P. **Sensores e biossensores eletroquímicos ferramentas versáteis para a determinação de contaminantes ambientais**. Fortaleza, Programa de Pós-Graduação em Química – Universidade Federal do Ceará, 2014. Tese de doutorado, 104 – 109 p.

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

RIBEIRO, W. F. **Determinação voltamétrica de ricina em mamona usando carbono vítreo e diamante dopado com boro**. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química – Universidade Federal da Paraíba, 2012. Tese de doutorado, 31 p.

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**. Salvador, Programa de Pós-Graduação em Química – Universidade Federal da Bahia, 2013. Tese de doutorado, 41, 101 p.

RODRIGUES, M. A. T. **Classificação de fungicidas de acordo com o mecanismo de ação proposto pelo FRAC**. Botucatu, Faculdade de Ciências Agrônômicas - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2006. Dissertação de mestrado, 06 p.

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.

SCHIAVON, M.; DALL'ACQUA, S.; MIETTO, A.; PILON-SMITS, E. A. H.; SAMBO, P., MASI, A. Selenium fertilization alters the chemical composition and antioxidant constituents of tomato (*Solanum lycopersicon* L.). **J. Agric. Food Chem.**, v. 61, p. 10542-10554, 2013.

SEDENHO, G. C. **Desenvolvimento de detector eletroquímico para cromatografia líquida de alta eficiência baseado em um eletrodo modificado com nanopartículas metálicas para determinação de ácidos carboxílicos em vinhaça de cana-de-açúcar.** Araraquara, Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista, 2016. Dissertação de mestrado, 25 p.

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.

SILVA, J. M.; SILVA, E. N.; FARIA, H. P.; PINHEIRO, T. M. M. Agrotóxico e Trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, n. 4, p. 891-903, 2005.

SKOOG, D. A; WEST, D, M; HOLLER, F. J; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica.** São Paulo: 8 ed. Editora Thomson , 2006. p. 655.

SOHRABI, M. R.; JAMSHIDI, S.; ESMAEILIFAR, A. Cloud point extraction for determination of Diazinon: Optimization of the effective parameters using Taguchi method. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 110, p. 49–54, 2012.

SOUZA, D; MACHADO, S. A. S; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.

SOUZA, P. H. M. **Estudos eletroquímicos de complexos de cu (ii) de antibióticos da classe das fluorquinolonas.** Belo Horizonte, Departamento de Química - Universidade Federal de Minas Gerais, 2011. Dissertação de mestrado, 12, 20 p.

STANGL, G.; NIESSNER, R. Cloud point extraction of napropamide and thiabendazole from water and soil. **Mikrochim. Acta**, v. 113, p. 1-8, 1994.

VIEIRA, E.; LICHTIG, J. Validação de métodos cromatográficos em análises de resíduos de pesticida. **Arquivos do Instituto Biológico.** São Paulo, v. 71, p. 1-74, 2004.

WANG, J. **Analytical Electrochemistry**, 2 ed. New York, 2000. p. 28, 29, 67.

WANG, Y.; HAN, J.; LIU, Y.; WANG, L.; NI, L.; TANG, X. Recyclable non-ligand dual cloud point extraction method for determination of lead in food samples. **Food Chemistry**, v.190, p.1130–1136, 2016.

WANG, Z. & DAI, Z. Extractive microbial fermentation in cloud point system. **Enz. Microb. Tech.**, 46: 407-418, 2010.

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.

XIE, S.; PAAU, M. C.; LI, C. F.; XIAO, D. & CHOI, M. M. F. Separation and preconcentration of persistent organic pollutants by cloud point extraction. **J. Chromatogr. A**, v. 1217, p. 2306-2317, 2010.

YANG, J.; ZHANG, D.; WANG, L.; LONG, N.; ZHANG, M.; ZHANG, L. An Electrochemical Method for High Sensitive Detection of Thiabendazole and Its Interaction with Human Serum Albumin. **Food Anal. Methods**, v. 8, p.507-514, 2015.

YANG, N; FOORD, J. S; JIANG, X. Diamond electrochemistry at the nanoscale: A review. **Carbon**, v. 99, p 90-110, 2016.

ZOU, Y.; LI, Y.; JIN, H.; TANG, H.; ZOU, D.; LIU, M.; YANG, Y. Determination of estrogens in human urine by high-performance liquid chromatography/diode array detection with ultrasound-assisted cloud-point extraction. **Analytical Biochemistry**. v. 421, p. 378-384, 2012.