



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CATALÃO - UFCAT
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
MESTRADO

WAGNER AIRES DE OLIVEIRA JÚNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO ANALÍTICO UTILIZANDO
MICROEXTRAÇÃO POR SORVENTE EMPACOTADO (MEPS) E HPLC-UV
PARA DETERMINAÇÃO DOS AGROTÓXICOS DIURON, PARATIONA
METÍLICA E CLOROTALONIL EM SUCOS DE FRUTAS.**

Catalão - GO
2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE QUÍMICA

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

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

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

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

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

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

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

2. Nome completo do autor

Wagner Aires de Oliveira Júnior

3. Título do trabalho

Desenvolvimento de um método analítico utilizando microextração por sorvente empacotado (MEPS) e HPLC-UV para determinação dos agrotóxicos diuron, parationa metílica e clorotalonil em sucos de frutas.

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

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

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

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

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

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

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



Documento assinado eletronicamente por **Silvia De Sousa Freitas, Professora do Magistério Superior**, em 29/08/2022, às 14:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **WAGNER AIRES DE OLIVEIRA JUNIOR, Discente**, em 30/08/2022, às 11:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3147615** e o código CRC **FBBE0468**.

WAGNER AIRES DE OLIVEIRA JÚNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO ANALÍTICO UTILIZANDO
MICROEXTRAÇÃO POR SORVENTE EMPACOTADO (MEPS) E HPLC-UV
PARA DETERMINAÇÃO DOS AGROTÓXICOS DIURON, PARATIONA
METÍLICA E CLOROTALONIL EM SUCOS DE FRUTAS.**

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

Orientadora: Professora Doutora
Silvia de Sousa Freitas

**Ficha de identificação da obra pelo bibliotecário documentalista
Joana Rocha de Souza / CRB-1 1465**

O048d Oliveira Júnior, Wagner Aires de.
Desenvolvimento de um método analítico utilizando microextração por sorvente empacotado (MEPS) e HPLC-UV para determinação dos agrotóxicos diuron, parationa metílica e clorotalonil em sucos de frutas [manuscrito] / Wagner Aires de Oliveira Júnior. - 2022.
CIV , 104 f.

Orientadora: Prof^a Dra. Silva de Sousa Freitas.
Dissertação [Mestrado] – Universidade Federal de Catalão (UFCAT), em implantação, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química – Catalão, 2022.

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

1. Microextração – sorvente empacotado. 2. HPLC. 3. Agrotóxicos. 4. Sucos de frutas. 5. Diuron. 6. Parationa metílica. 7. Clorotalonil. I. Freitas, Sílvia de Sousa, Orient. II. Título.

CDU: 632.934



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE QUÍMICA
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 17 da sessão de Defesa de Dissertação de **Wagner Aires de Oliveira Júnior**, que confere o título de Mestre(a) em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química da UFCAT.

Aos vinte e seis dias do mês de agosto de dois mil e vinte e dois, a partir das 09:00 horas, por videoconferência do google meet (meet.google.com/ogm-njnx-zer), realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO ANALÍTICO UTILIZANDO MICROEXTRAÇÃO POR SORVENTE EMPACOTADO (MEPS) E HPLC-UV PARA DETERMINAÇÃO DOS AGROTÓXICOS DIURON, PARATIONA METÍLICA E CLOROTALONIL EM SUCOS DE FRUTAS.**” na área de concentração em Química. Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Professora Doutora Silvia de Sousa Freitas (PPGQ | UFCAT) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor Álvaro José Dos Santos Neto (USP-IQSC), membro titular externo; Professora Doutora Vanessa Nunes Alves (PPGQ-UFCAT), membro titular interno cujas participações ocorreram por meio de videoconferência. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestões de pequenas alterações e complementações no trabalho final. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Professora Doutora Silvia de Sousa Freitas, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Não houve alteração no título



Documento assinado eletronicamente por **Silvia De Sousa Freitas, Professora do Magistério Superior**, em 26/08/2022, às 12:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Nunes Alves, Professor do Magistério Superior**, em 29/08/2022, às 17:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lincoln Lucílio Romualdo, Coordenador de Pós-graduação**, em 05/09/2022, às 15:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3138094** e o código CRC **6A5FD325**.

NOTA NAS DISSERTAÇÕES

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha base familiar, mãe e pai, Iracilda e Wagner, que apesar de nunca terem contato com a educação superior, me incentivaram e valorizaram o ensino público e de qualidade.

A minha irmã, Dábila, que foi a primeira da família a empreitar a difícil tarefa de se tornar graduada, mostrando então um futuro longínquo, trazendo para a minha realidade uma nova perspectiva.

A Fundação Espírita Nova Vida – FENOVA, que me acolheu desde meus 7 anos de idade, onde eu pude adquirir conhecimentos e experiências que irão me guiar por todas as decisões tomadas no decorrer da minha vida.

Aos meus amigos Raissa, Elixandre, Deborah, Wygny, Gustavo, Jussara, Jordana, Alicia e Douglas, pela ajuda, contribuição, conversas e segurança que me passaram ao longo desses anos.

A Universidade Federal de Catalão (UFCAT) e ao Programa de Pós-graduação em Química da UFCAT, por possibilitarem meu desenvolvimento acadêmico e científico.

A CAPES pela bolsa de pesquisa concedida, e os demais órgãos de fomento, FAPEG e CNPq, pelo apoio financeiro.

Agradeço especialmente, a minha orientadora, Professora Dra. Silvia de Sousa Freitas que tanto me inspira, mostrando os caminhos científicos e mediando os desafios encontrados durante esse trabalho, de maneira que minhas pesquisas futuras serão também parte da sua história.

E por fim, dedico este trabalho a pesquisa científica brasileira, no desenvolvimento de métodos analíticos, compartilhando os resultados encontrados neste trabalho com o intuito de contribuir com a ampliação desta ciência.

RESUMO

A produtividade agrícola está ligada diretamente a aplicação de agrotóxicos nas lavouras para o combate de fungos, ervas daninhas, insetos e outras pragas que diminuem o rendimento das culturas. O uso em grande escala desses produtos químicos aumenta a probabilidade de resíduos em diversas matrizes, que devido aos seus efeitos nocivos, são um risco para todo o ecossistema, sendo que no Brasil já foram apontados casos de danos genéticos, câncer de mama, transtornos depressivos e outras anomalias ligados ao contato humano com essas substâncias. Uma das principais fontes de contaminação humana por agrotóxicos são os alimentos, o que torna necessária a avaliação contínua dos níveis de resíduos de agrotóxicos nessa matriz, de modo a apontar a qualidade do alimento e estimar a exposição humana a esses compostos prejudiciais. Dentre diversos alimentos, o suco de fruta se destaca por ser uma bebida saborosa e muito nutritiva, sendo um alimento apreciado por toda a faixa etária da população mundial, desse modo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico utilizando microextração por sorvente empacotado (MEPS) e HPLC-UV para a determinação dos agrotóxicos diuron, parationa metílica e clorotalonil em sucos de maçã, morango, abacaxi, uva e caju. A MEPS é uma técnica de preparo de amostra que as etapas de extração, pré-concentração e limpeza da amostra, acontecem em um único dispositivo que opera em microlitros, o que possibilita a automatização do sistema e o desenvolvimento de métodos com baixo consumo de solvente, amostra e sorvente. Para o desenvolvimento do método proposto neste trabalho, suco de maçã foi utilizado como matriz representativa e foram avaliados oito fatores que afetam o desempenho da técnica MEPS, sendo eles: fase extratora, modo e número de ciclos de carregamento da amostra, volume de carregamento da amostra, etapa de limpeza da amostra carregada, solvente de eluição, volume e ciclos de eluição. As condições ótimas para o método desenvolvido proporcionaram alta eficiência de extração e pré-concentração, aumentando muito a detectabilidade dos agrotóxicos no HPLC-UV, além de proporcionar a reutilização do sorvente C18 por mais de 70 vezes sem perda de eficiência na extração, alcançando valores acima de 18,2 para o fator de concentração.

Os resultados da validação analítica, utilizando a matriz representativa (suco de maçã), atenderam aos critérios de aceitabilidade da ANVISA e Comissão Europeia, nos quais o LD variou de 0,0010 e 0,0015 mg L⁻¹, o LQ de 0,0050 e 0,0100 mg L⁻¹ e a faixa linear para os três agrotóxicos incluiu a concentração do LQ de cada composto até 1,0000 mg L⁻¹, atendendo as concentrações estabelecidas para LMR pelas legislações para agrotóxicos em alimentos. A recuperação do método variou entre 87,5% e 112,2%, com DPR ≤ 11%. Para consolidar a validação analítica, ensaios complementares foram realizados para todas as matrizes estudadas, com resultados de recuperação variando entre 67,0% e 119,6% e DPR ≤ 20,2%, contemplando os critérios de aceitação dos protocolos de validação.

Palavras-chave: Microextração por sorvente empacotado. HPLC. Agrotóxicos. Suco de fruta. Diuron. Parationa metílica. Clorotalonil.

ABSTRACT

Agricultural productivity is directly linked to the application of pesticides in crops and their large-scale use increases the probability of residues in various matrices, which due to their harmful effects, are a risk to the entire ecosystem. One of the main sources of human contamination by pesticides is food, which makes it necessary to continuously assess the levels of pesticide residues in this matrix, in order to identify the quality of the food and estimate human exposure to these harmful compounds. Among several foods, fruit juice stands out for being a tasty and very nutritious drink, being a food appreciated by the entire age group of the world population, in this way, the objective of this work was to develop and validate an analytical method using microextraction in packed sorbent (MEPS) and HPLC-UV for the determination of diuron, methyl parathion and chlorothalonil pesticides in apple, strawberry, pineapple, grape and cashew juices. MEPS is a sample preparation technique where the sample extraction, pre-concentration and cleaning steps take place in a single device that operates in microliters, which allows for the automation of the system and the development of methods with low solvent consumption. sample and sorbent. For the development of the method proposed in this work, apple juice was used as a representative matrix and eight factors that affect the performance of the MEPS technique were evaluated. The optimal conditions for the developed method provided high extraction and pre-concentration efficiency, greatly increasing the detectability of pesticides in the HPLC-UV, in addition to providing the reuse of the C18 sorbent for more than 70 times without loss of efficiency in the extraction, reaching values above 18.2 for the concentration factor.

The results of the analytical validation, using the representative matrix (apple juice), met the acceptability criteria of ANVISA and the European Commission, where the LOD ranged from 0.0010 and 0.0015 mg L⁻¹, the LOQ from 0.0050 and 0.0100 mg L⁻¹ and the linear range for the three pesticides included the LOQ concentration of each compound up to 1.0000 mg L⁻¹, meeting the concentrations established for MRL by the legislation for pesticides in food. Method recovery ranged from 87.5% to 112.2%, with RSD ≤ 11%. To consolidate the analytical validation, additional tests were performed for all matrices studied, with recovery results ranging between 67.0% and 119.6% and RSD ≤ 20.2%, considering the acceptance criteria of the validation protocols.

Key-words: Microextraction in packed sorbent. HPLC. Pesticides. Fruit juice. Diuron. Methyl parathion. Chlorothalonil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do diuron.....	15
Figura 2. Estrutura química da parationa metílica.....	17
Figura 3. Estrutura química do clorotalonil.....	19
Figura 4. Diferentes formatos de dispositivos em microextração por sorvente empacotado (MEPS).....	29
Figura 5. Ilustração das etapas do processo MEPS com microcartucho BIN (<i>Barril Insert and Needle</i>)	30
Figura 6. (1) Ilustração do microdispositivo de extração desmontado e da microseringa utilizados para MEPS. (2-4) Montagem do microdispositivo com a fase extratora empacotada. (5) Acoplamento do microdispositivo à seringa.....	45
Figura 7. Fluxograma do procedimento MEPS padrão utilizado inicialmente	46
Figura 8. Cromatograma, obtido por HPLC, da mistura de padrões: 1 - diuron 0,2000 mg L ⁻¹ (t _R = 5,4 min); 2 – parationa metílica 0,5000 mg L ⁻¹ (t _R = 6,7 min); 3 - clorotalonil 0,5000 mg L ⁻¹ (t _R = 8,1 min).....	54
Figura 9. Cromatograma, obtido por HPLC, para a amostra de suco de maçã	55
Figura 10. Fator de concentração médio (n=3) dos compostos usando MEPS com diferentes fases extratoras.....	57
Figura 11. Fator de concentração médio (n=3) dos compostos nos modos de carregamento (A) “aspirar-devolver” e (B) “extrair-descartar”, usando MEPS com fase extratora C18	59
Figura 12. Fator de concentração médio (n=3) dos compostos usando MEPS com fase extratora C18, para diferentes números de ciclos “extrair-descartar”	61
Figura 13. Fator de concentração médio (n=3) dos compostos usando MEPS com fase extratora C18 e eluição com diferentes solventes	64
Figura 14. Comparação dos cromatogramas, obtido por HPLC, para os compostos diuron (t _R = 5,4 min), parationa metílica (t _R = 6,7 min) e clorotalonil (t _R = 8,1 min) após a eluição dos compostos com: (a) acetonitrila pura (100%) e (b) ACN:H ₂ O (70:30, v/v)	65
Figura 15. Fator de concentração médio (n=3) dos compostos usando MEPS com fase extratora C18 e eluição com ACN:H ₂ O (70:30, v/v), 10 ciclos de eluição e diferentes solventes volumes de eluição	66
Figura 16. Cromatogramas, obtido por HPLC, para os compostos diuron (t _R = 5,4 min), parationa metílica (t _R = 6,7 min) e clorotalonil (t _R = 8,1 min) na solução padrão e após MEPS com fase extratora C18, e eluição com 60 µL da mistura ACN:H ₂ O (70:30, v/v)	67
Figura 17. Fator de concentração médio (n=3) dos compostos usando MEPS com fase extratora C18, eluição com 60 µL de ACN:H ₂ O (70:30, v/v) e diferentes números de ciclos de eluição.....	69
Figura 18. Cromatogramas da amostra branco e da amostra fortificada (0,0500 mg L ⁻¹), após o processo de extração por MEPS. (1) diuron (t _R = 5,4 min); (2) parationa metílica (t _R = 6,7 min); (3) clorotalonil (t _R = 8,1 min).....	72
Figura 19. Curvas de calibração obtidas para os agrotóxicos (a) diuron, (b) parationa metílica e (c) clorotalonil.....	75

- Figura 20.** Cromatograma da amostra comercial de **suco de maçã “a”**, branco e fortificado ($0,4000 \text{ mg L}^{-1}$), após o processo de extração por MEPS, com os agrotóxicos diuron ($t_R = 5,4 \text{ min}$), parationa metílica ($t_R = 6,7 \text{ min}$) e clorotalonil ($t_R = 8,1 \text{ min}$).....82
- Figura 21.** Cromatograma da amostra comercial de **suco de maçã “b”**, branco e fortificado ($0,4000 \text{ mg L}^{-1}$), após o processo de extração por MEPS, com os agrotóxicos diuron ($t_R = 5,4 \text{ min}$), parationa metílica ($t_R = 6,7 \text{ min}$) e clorotalonil ($t_R = 8,1 \text{ min}$).....83
- Figura 22.** Cromatograma da amostra comercial de **suco de abacaxi**, branco e fortificado ($0,4000 \text{ mg L}^{-1}$), após o processo de extração por MEPS, com os agrotóxicos diuron ($t_R = 5,4 \text{ min}$), parationa metílica ($t_R = 6,7 \text{ min}$) e clorotalonil ($t_R = 8,1 \text{ min}$).....83
- Figura 23.** Cromatograma da amostra comercial de **suco de morango**, branco e fortificado ($0,4000 \text{ mg L}^{-1}$), após o processo de extração por MEPS, com os agrotóxicos diuron ($t_R = 5,4 \text{ min}$), parationa metílica ($t_R = 6,7 \text{ min}$) e clorotalonil ($t_R = 8,1 \text{ min}$).....83
- Figura 24.** Cromatograma da amostra comercial de **suco de uva**, branco e fortificado ($0,4000 \text{ mg L}^{-1}$), após o processo de extração por MEPS, com os agrotóxicos diuron ($t_R = 5,4 \text{ min}$), parationa metílica ($t_R = 6,7 \text{ min}$) e clorotalonil ($t_R = 8,1 \text{ min}$)84
- Figura 25.** Cromatograma da amostra comercial de **suco de caju**, branco e fortificado ($0,4000 \text{ mg L}^{-1}$), após o processo de extração por MEPS, com os agrotóxicos diuron ($t_R = 5,4 \text{ min}$), parationa metílica ($t_R = 6,7 \text{ min}$) e clorotalonil ($t_R = 8,1 \text{ min}$)84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características do agrotóxico diuron	16
Tabela 2. Características do agrotóxico parationa metílica	18
Tabela 3. Características do agrotóxico clorotalonil	20
Tabela 4. Estudos de determinação de agrotóxicos em sucos	23
Tabela 5. Resultados por frutas do relatório PARA (2017-2018)	24
Tabela 6. Trabalhos empregando técnicas miniaturizadas para o preparo de amostra na determinação de agrotóxicos	27
Tabela 7. Condições experimentais utilizadas no procedimento MEPS em todas as etapas de otimização	47
Tabela 8. Condições experimentais utilizadas no procedimento MEPS para a otimização da fase extratora	49
Tabela 9. Condições experimentais utilizadas no procedimento MEPS para a otimização do modo de carregamento da amostra no dispositivo	49
Tabela 10. Condições experimentais utilizadas no procedimento MEPS para a otimização do número de ciclos de carregamento da amostra no dispositivo	49
Tabela 11. Condições experimentais utilizadas no procedimento MEPS para a otimização do tipo de solvente utilizado para eluição dos analitos	49
Tabela 12. Condições experimentais utilizadas no procedimento MEPS para a otimização do volume do solvente utilizado para eluição dos analitos	50
Tabela 13. Condições experimentais utilizadas no procedimento MEPS para a avaliação da etapa adicional de limpeza da amostra carregada	50
Tabela 14. Condições experimentais utilizadas no procedimento MEPS para a otimização do número de ciclos de eluição dos analitos	50
Tabela 15. Critérios de validação para limite de quantificação e linearidade	73
Tabela 16. Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e resultados de linearidade para o método desenvolvido	73
Tabela 17. Limites máximos de resíduo (mg L^{-1}) estabelecidos pela ANVISA	76
Tabela 18. Sumário dos resultados de recuperação (R, %) e desvio padrão relativo (DPR, %) obtidos nos ensaios intradia e interdia para os agrotóxicos pelo método MEPS/HPLC-UV proposto	78
Tabela 19. Resultados obtidos para a análise das amostras de sucos de frutas comerciais pelo método proposto (n=3)	80
Tabela 20. Comparação do método proposto com outros métodos	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina Trifosfato
BIN	Do inglês <i>Barrel Insert and Needle</i>
C18	Octadecilsilano
C2	Etilsilano
C8	Octilsilano
CAC	Do inglês <i>Codex Alimentarius Commission</i>
CN	Cianopropilsilano
CV	Coefficiente de Variação
DCOIT	Diclorooctilisotiazolinona
DES	Solvente Eutético Profundo, do inglês <i>Deep Eutectic Solvent</i>
DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva, do inglês <i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>
DPR	Desvio Padrão Relativo
DSPE	Extração em Fase Sólida Dispersiva, do inglês <i>Dispersive Solid Phase Extraction</i>
FIA	Análise por Injeção em Fluxo, do inglês <i>Flow Injection Analysis</i>
GC	Cromatografia Gasosa, do inglês <i>Gas chromatography</i>
GC-ECD	Cromatografia Gasosa com detecção por Captura de Elétrons, do inglês <i>Gas Chromatography - Electron Capture Detector</i>
GC-FID	Cromatografia Gasosa com detecção de Ionização de Chama, do inglês <i>Gas Chromatography - Flame Ionization Detector</i>
GC-FPD	Cromatografia Gasosa com Detector Fotométrico de Chama, do inglês <i>Gas Chromatography - flame photometric detection</i>
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês <i>Gas Chromatography - Mass Spectrometry</i>
GC-MS/ MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem, do inglês <i>Gas Chromatography - Tandem Mass Spectrometry</i>
GC-NPD	Cromatografia Gasosa com Detector de Nitrogênio-Fósforo, do inglês <i>Gas Chromatography – Nitrogen Phosphorus detector</i>
HF-LPME	Microextração em Fase Líquida suportada com Fibra Oca, do inglês <i>Hollow-fiber liquid phase microextraction</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector</i>
HPLC-MS/MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa em Tandem, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry</i>
HPLC-QTOF-MS/ MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas em Tandem do tipo Quadrupolo-tempo de Voo, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography – Quadrupole Time of Flight – Tandem Mass Spectrometry</i>
HPLC-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography and Ultraviolet Detection</i>
HS-SDME	Microextração em Gota Única por <i>Headspace</i> , do inglês <i>headspace-single drop microextraction</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LC	Cromatografia Líquida, do inglês <i>Liquid Chromatography</i>
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem, do inglês <i>Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry</i>
LC-QTOF-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem do tipo Quadrupolo-Tempo de Voo, do inglês <i>Liquid Chromatography – Quadrupole Time of Flight – Tandem Mass Spectrometry</i>
LLE	Extração Líquido-Líquido, do inglês <i>Liquid-Liquid Extraction</i>
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LPME	Microextração em Fase Líquida, do inglês <i>Liquid-Phase Microextraction</i>
LT-DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva de Baixa Toxicidade, do inglês <i>Low Toxicity Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>
MD-GC-MS	Cromatografia Gasosa Multidimensional por Frações Parciais, do inglês <i>Heart-Cutting Multidimensional Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i>
MEKC	Cromatografia Eletrocinética Micelar, do inglês <i>Micellar Electrokinetic Chromatography</i>
MeOH	Metanol
MEPS	Microextração por sorvente empacotado, do inglês <i>Microextraction by Packed Sorbent</i>
MIPs	Polímeros Molecularmente Impressos, do inglês <i>Molecularly Imprinted Polymers</i>
MSPD	Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês <i>Matrix Solid-Phase Dispersion</i>
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PSA	Propileno-diaminossilano
PTFE	Politetrafluoretileno
PT- μ SPE	Microextração em fase sólida com ponta de pipeta, do inglês <i>pipette-tip micro-solid phase extraction</i>
QuEChERS	Do inglês <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
RGO-ZnO	Óxido de Grafeno Reduzido revestido com Nanopartículas de Óxido de Zinco, do inglês <i>reduced graphene oxide coated with ZnO nanoparticles</i>
R	Recuperação
SBSE	Extração Sortiva em Barra de Agitação, do inglês <i>Stir Bar Sorptive Extraction</i>
SDME	Microextração em Gota Única, do inglês <i>single drop microextraction</i>
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SPE	Extração em Fase Sólida, do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>
SPME	Microextração em Fase Sólida, do inglês <i>Solid Phase Microextraction</i>
TCMTB	2-(tiocianometiltio) benzotiazol
T _R	Tempo de Retenção
UA-DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Assistida por Ultrassom, do inglês <i>Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>
UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência, do inglês <i>Ultra-Performance Liquid Chromatography</i>
US-FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
UV-VIS	Ultravioleta-Visível
VALLME	Microextração Líquido-Líquido assistida por Vórtex, do inglês <i>Vortex-Assisted Liquid-Liquid Microextraction</i>
VA-MSPD	Dispersão de Matriz em Fase Sólida Assistida por Vórtex, do inglês <i>Vortex-Assisted Matrix Solid Phase Dispersion</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Agrotóxicos	12
1.1.1 Agrotóxicos selecionados para o estudo.....	15
1.2 Frutas e suco de frutas	21
1.3 Métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos	24
1.3.1 Técnicas de preparo de amostra.....	26
1.3.1.1 Microextração por sorvente empacotado (MEPS)	28
1.4 Métodos cromatográficos e determinação de resíduos de agrotóxicos	32
1.5 Validação de métodos analíticos	35
1.5.1 Parâmetros analíticos	36
2. OBJETIVO	41
2.1 Objetivo geral	41
2.2 Objetivos específicos.....	41
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	42
3.1 Materiais e reagentes utilizados.....	42
3.2 Instrumentação.....	42
3.3 Preparo das amostras de suco de maçã.....	43
3.4 Preparo das amostras de sucos comerciais	43
3.5 Dispositivo usado para MEPS	44
3.6 Procedimento MEPS	45
3.7 Otimização do procedimento MEPS	47
3.8 Procedimento para validação do método.....	50
3.8.1 Seletividade	50
3.8.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	51
3.8.3 Linearidade	51
3.8.4 Exatidão e precisão.....	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1 Análise dos agrotóxicos por HPLC-UV	53
4.2 Otimização do procedimento MEPS	55
4.2.1 Otimização da etapa de amostragem	56
4.2.1.1 Seleção do material utilizado como fase extratora	56
4.2.1.2 Seleção do modo de carregamento da amostra.....	58
4.2.1.3 Seleção do número de ciclos de carregamento da amostra	60
4.2.2 Otimização da etapa de eluição dos analitos	63
4.2.2.1 Seleção do tipo de solvente utilizado para eluição	63
4.2.2.2 Seleção do volume de solvente utilizado para eluição	66
4.2.2.3 Avaliação da etapa adicional de limpeza da amostra carregada..	68
4.2.2.4 Seleção do número de ciclos de eluição	69
4.3 Validação do método MEPS/HPLC-UV	71
4.3.1 Seletividade	71
4.3.2 Limite de detecção, limite de quantificação e linearidade.....	73
4.3.3 Exatidão e precisão.....	77

4.4 Análise de amostras comerciais.....	79
4.5 Reutilização do microdispositivo, efeito de memória e eficiência após múltiplas análises	85
4.6 Comparação do método desenvolvido com outras abordagens.....	86
5. CONCLUSÃO.....	88
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 Agrotóxicos

Os agrotóxicos são produtos químicos destinados a matar ou controlar pragas (organismos prejudiciais) e doenças de plantas, que em geral bloqueiam rapidamente e eficientemente um processo metabólico vital do organismo vivo alvo, como por exemplo interferindo em seu processo reprodutivo. Eles podem ser utilizados na agricultura combatendo insetos, fungos, ácaros, ervas daninhas; na pecuária, no controle de carrapatos, mosca-do-chifre e pulgas; e domiciliar, para combater pulgas e larvas em plantas, eliminar cupins, ratos, baratas, algas em piscinas, carrapatos e pulgas em animais (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Esse grupo de substâncias químicas também são nomeadas como pesticidas, defensivos agrícolas, remédio de planta, veneno, entre outros, contudo a legislação federal brasileira, por intermédio da Lei Federal nº 7.802 de 11 de julho de 1989, conhecida como “Lei dos Agrotóxicos”, determina que o termo “agrotóxico” seja adotado para referir-se a todas as categorias de uso dessas substâncias (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009; BRASIL, 1989).

A “Lei dos Agrotóxicos” (Lei 7802/1989) foi regulamentada pelo Decreto 4074/2002, e dispõe sobre:

Pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências (BRASIL, 1989).

Essa mesma Lei, define em seu artigo 2º, os agrotóxicos e afins como sendo:

Os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa

de seres vivos considerados nocivos e substâncias, incluindo produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 1989).

O uso de agrotóxicos na agricultura é relatado há mais de 3.000 anos, porém foi após a segunda guerra mundial e com a revolução agrícola, que as indústrias químicas e o comércio mundial voltaram-se para a comercialização dessas substâncias. No Brasil, assim como em outros países que tinham a agricultura como base econômica, a introdução da comercialização de agrotóxicos veio por incentivo das organizações financiadoras que pré-estabeleciam uma porcentagem do financiamento para a compra de agroquímicos e tecnologias, buscando a modernização agrária e conseqüentemente o aumento na produção e produtividade (NEVES *et al.*, 2020; LUCCHESI, 2005; IPEA, 2019).

O aumento do rendimento na produção agrícola a partir do uso indiscriminado dos agrotóxicos levou a diversos casos de contaminação humana e do ecossistema, o que colocou em discussão os efeitos nocivos dessas substâncias aos organismos não alvo (CARVALHO; NODARI, E.; NODARI, R., 2017; NEVES *et al.*, 2020). Vários estudos apontam o impacto dos pesticidas na saúde, o trabalho de Paumgarten (2020) levantou a relação entre a utilização de agrotóxicos e a saúde pública no Brasil, apontando casos e riscos emergentes como o envenenamento agudo e suicídio, danos genéticos, câncer de mama, câncer de cólon, linfoma não Hodgkin, melanoma cutâneo (melanoma de pele), transtornos depressivos e disfunção na fertilidade masculina.

Um relatório publicado pela *Friends of the Earth Europe* (uma rede internacional de organizações ambientais) discute a ofensiva do lobby dos agrotóxicos da União Europeia no Brasil, onde é apresentado um levantamento mostrando que o uso de agrotóxicos no Brasil aumentou em seis vezes nos últimos 20 anos e que grandes empresas europeias tiveram 45 novos agrotóxicos aprovados nos últimos 3 anos, sendo que 19 deles contém substâncias banidas na Europa. O documento também mostra que a cada 2 dias morre uma pessoa por envenenamento por agrotóxicos no Brasil, sendo cerca de 20% das vítimas com idades entre 0 e 19 anos (BOMBARDI; CHANGOE, 2022).

A intoxicação humana por esses agentes químicos pode ser aguda, quando a exposição ocorre a altas concentrações em um curto período de tempo, ou crônica, que decorre de contatos múltiplos com baixas concentrações por longos períodos de tempo,

sendo que uma das principais fontes de contaminação crônica e aguda são os alimentos (RÓDIO, ROSSET, BRANDALIZE, 2021).

Por esse motivo, programas de prevenção e controle de resíduos de agrotóxicos em alimentos são fundamentais para medir os riscos à saúde humana, devido a exposição a alimentos que contenham resíduo dessas substâncias (PARA, 2008). No Brasil, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) é o responsável por avaliar continuamente, os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos de origem vegetal, apontando a qualidade dos alimentos adquiridos pela população. O programa é uma ação do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) e é coordenado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ANVISA, 2020).

O último relatório publicado pelo PARA foi em 2019, apresentando os resultados das 4.616 amostras analisadas no período de 2017-2018. No qual foram avaliados 14 alimentos de origem vegetal, que juntos, representam 30,86% dos alimentos de origem vegetal consumidos pelos brasileiros. Incluíram-se 270 agrotóxicos na pesquisa, e desses, 122 foram detectados (PARA, 2019).

Segundo o relatório, 28% das amostras continham resíduos de agrotóxicos dentro do Limite Máximo de Resíduos (LMR), outros 23% apresentaram inconformidades e 0,86% apresentaram potenciais situações de risco agudo. De todas as amostras analisadas 13,95% continham de 5 a mais de 10 resíduos de diferentes pesticidas. Os riscos à saúde humana para a contaminação aguda ou crônica são estimados individualmente para cada substância, não considerando os efeitos aditivos da mistura de resíduos, por exemplo, a exposição de resíduos de diferentes agrotóxicos que possuam o mesmo mecanismo de ação tóxico (PARA, 2019).

O decreto nº 4.074/2002 que regulamenta a “Lei dos agrotóxicos” traz, no seu inciso XLIV do seu artigo 1º, a definição de resíduo como:

Substância ou mistura de substâncias remanescente ou existente em alimentos ou no meio ambiente decorrente do uso ou da presença de agrotóxicos e afins, inclusive, quaisquer derivados específicos, tais como produtos de conversão e de degradação, metabólitos, produtos de reação e impurezas, consideradas toxicológicas e ambientalmente importantes (BRASIL, 2002).

1.1.1 Agrotóxicos selecionados para o estudo

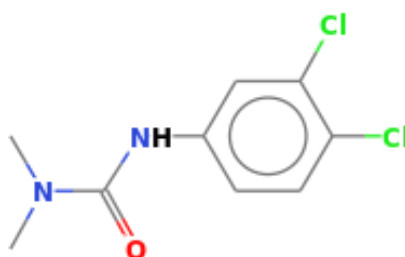
Para o desenvolvimento deste estudo, os agrotóxicos diuron, parationa metílica e clorotalonil foram selecionados. Esses três agrotóxicos pertencem a grupos químicos diferentes, assim como, classes de aplicação distintas, avaliando a amplitude de aplicação do método desenvolvido.

Dados do último relatório do PARA, trazem as detecções irregulares por grupo químico. Vinte grupos químicos foram encontrados sessenta ou mais vezes; dentre eles, os agrotóxicos triazóis foram os mais detectados (1187 vezes), os organofosforados foram constatados 827 vezes, a classe das ureias com 60 detecções e as isoftalonitrilas, com 73 também estavam entre os selecionados (PARA, 2019).

Os agrotóxicos escolhidos para o estudo contemplaram três das classes químicas mais encontradas (organofosforados, isoftalonitrilas, ureias), além de três classes de aplicação (herbicida, inseticida, fungicida). Uma breve discussão sobre eles, discorre a seguir.

O diuron (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilureia) é um herbicida de fórmula molecular $C_9H_{10}Cl_2N_2O$, parcialmente polar, não ionizável, pertencente ao grupo químico das feniluréias (ureia) (ARAUJO *et al.*, 2012). No Brasil é comercializado em 62 produtos distintos, sendo sua utilização permitida em 12 culturas, entre elas abacaxi, banana, café, citros, soja e uva, em aplicações pré e pós-emergência das plantas infestantes. No cultivo de algodão é utilizado como dessecante e no uso não agrícola é permitido a sua aplicação em ferrovias, rodovias, pistas de aeroportos, entre outros. Esse agrotóxico é considerado moderadamente tóxico (classificação toxicológica: classe III) e seu LMR ($mg\ kg^{-1}$) para as culturas autorizadas varia entre 0,05, para a cultura de milho, e 2,00, para a cultura de alfafa (ANVISA, 2022a; AGROFIT, 2022). Na **figura 1** encontra-se a estrutura química do diuron.

Figura 1. Estrutura química do diuron.



Fonte: National Institute of Standards and Technology (NIST, 2022a).

Esse herbicida atua inibindo a fotossíntese, impedindo a produção de oxigênio e bloqueia especificamente a reação de Hill que produz energia (ATP) (GIACOMAZZI; COCHET, 2004; HUOVINEN *et al.*, 2015). O diuron, comparado a outros agrotóxicos, possui uma persistência relativamente alta, sendo degradado lentamente na água e no meio ambiente, onde, dependendo das condições ambientais pode persistir por 1 mês a 1 ano ou mais (ARAUJO *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2021). Algumas características e propriedades deste composto são apresentadas na **tabela 1**.

Tabela 1. Características do agrotóxico diuron.

Diuron	
CAS	330-54-1
Massa Molecular	233,09 g mol ⁻¹
Solubilidade em Água	37,3 mg L ⁻¹ (25 °C)
LogP _{ow}	2,68
Ingestão Diária Aceitável (IDA)	0,007 mg kg ⁻¹

Fonte: SCIFINDER, 2021; CHIOU; SCHMEDDING; MANES, 2005; EUROPEAN COMMISSION, 2022a.

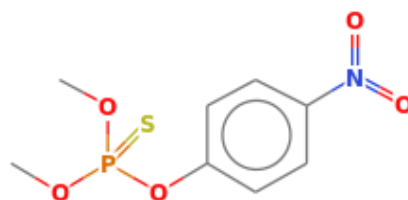
O diuron é considerado como um provável cancerígeno humano pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, pois estudos apontam que após a exposição ao agrotóxico foram descobertos carcinomas na bexiga e rim de ratos, e na glândula mamária de camundongos; além de desencadear necrose da mucosa da bexiga urinária de ratos (HUOVINEN *et al.*, 2015). As informações sobre a toxicidade relacionada ao diuron em humanos são escassas, mas após a ingestão ele é absorvido pelo sistema gastrointestinal e extensivamente metabolizado, produzindo metabólitos tóxicos excretados na urina e nas fezes (ROCHA, *et al.*, 2013; MOHAMMED, *et al.*, 2018).

Métodos analíticos para a determinação de diuron já foram estudados para diversas matrizes, sendo a maioria dos trabalhos encontrados, voltados para a análise de resíduo desse agrotóxico em água e espécies aquáticas. No trabalho de Tekin *et al.* (2020), o diuron foi determinado em amostras de algas marinhas utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem do tipo quadrupolo-tempo de voo (LC-QTOF-MS/MS). Os autores Lourencetti, Marchi e Ribeiro (2008) desenvolveram e validaram um método analítico empregando extração em fase sólida e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (HPLC-UV) para a determinação dos herbicidas diuron, hexazinona e tebuthiuron em solo e solo tratado com vinhaça de cana-de-açúcar.

No trabalho de Barbieri *et al.* (2019), foi desenvolvido um método para determinação de multirresíduos de pesticidas em músculo de peixes frescos empregando a técnica de extração QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) e análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS). Após a validação do método analítico, foram realizadas análises em espécies de peixes coletados no rio Ádige (Itália) e resíduos de diuron e outros agrotóxicos foram encontrados. Um outro trabalho, utilizou a técnica de análise por injeção em fluxo (FIA) usando sensor eletroquímico modificado, para a determinação de diuron e carbofurano em amostras de alimentos e solo (WONG; SOTOMAYOR, 2014).

A parationa metílica (O,O-dimetil,O-4-nitrofenil fosforotioato) possui fórmula molecular $C_8H_{10}NO_5PS$ e é um inseticida e acaricida organofosforado (grupo de substâncias químicas que são ésteres fosfóricos compostas por um átomo de fósforo pentavalente) e sua estrutura química está representada na **figura 2**. O inseticida é classificado como extremamente tóxico pela Organização Mundial da Saúde, e comparado a outros grupos de agrotóxicos, possui uma baixa persistência ambiental, sendo utilizado principalmente nas culturas de algodão, arroz, feijão e algumas frutas e vegetais (URIÓSTEGUI-ACOSTA, *et al.*, 2020; JOHN, *et al.*, 2001; XUE, *et al.*, 2014; WU, *et al.*, 2019).

Figura 2. Estrutura química da parationa metílica.



Fonte: National Institute of Standards and Technology (NIST, 2022b).

Esse agrotóxico, assim como os demais agrotóxicos organofosforados, são potentes agentes neurotóxicos que inibem irreversivelmente a atividade da enzima acetilcolinesterase nos tecidos alvo (sistema nervoso central e periféricos) por meio de uma reação de substituição nucleofílica, o que acarreta no acúmulo de acetilcolina e subsequente morte dos insetos. Nos humanos, afeta as funções nervosas resultando em náusea, tontura, paralisia respiratória e morte (URIÓSTEGUI-ACOSTA *et al.*, 2020; JOHN, *et al.*, 2001; XUE, *et al.*, 2014; WU, *et al.*, 2019). Na **tabela 2**, estão relacionadas algumas propriedades desse composto.

Tabela 2. Características do agrotóxico parationa metílica.

Parationa metílica	
CAS	298-00-0
Massa Molecular	263,5 g mol ⁻¹
Solubilidade em Água	60 mg L ⁻¹ (25 °C)
LogP	3,32
Ingestão Diária Aceitável (IDA)	0,003 mg Kg ⁻¹

Fonte: SCIFINDER, 2021; CHIOU; SCHMEDDING; MANES, 2005; ANVISA, 2022b.

Embora esse agrotóxico seja altamente eficaz no combate a insetos, seus resíduos em frutas, vegetais e águas naturais representam alto risco à saúde humana e ao ecossistema (WU, *et al.*, 2019). A exposição tem sido associada a diversos danos à saúde em diferentes sistemas orgânicos, principalmente no sistema reprodutivo e no sistema nervoso, sendo que já foram relatados danos ao DNA em ratos após o contato com a parationa metílica (KALENDER *et al.*, 2007). Devido a todos esses efeitos adversos aos sistemas não-alvo o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis para a determinação de resíduos da parationa metílica, são necessários (XUE *et al.*, 2014).

O uso da parationa metílica no Brasil foi proibido a partir de 1º de setembro de 2016 após reavaliação toxicológica realizada pela ANVISA, que considerou o princípio ativo como mutagênico e causador de danos ao sistema reprodutor, sendo mais perigoso para o homem do que demonstrado em testes com animais de laboratório e possui indícios de causar distúrbios hormonais (ANVISA, 2016; FIOCRUZ).

Esse agrotóxico era avaliado pela ANVISA como extremamente tóxico (classe I) e era permitido nas culturas de algodão (LMR 0,3 mg kg⁻¹), soja (LMR 0,1 mg kg⁻¹), alho, arroz, batata, cebola, feijão, milho e trigo por aplicação foliar (ANVISA, 2022b; MINISTÉRIO DA SAÚDE; ANVISA, 2015). Nos últimos relatórios do PARA (2013-2018), a parationa metílica foi investigada em 13.361 amostras, sendo detectada em 3 amostras no ano de 2014 e em outras 3 no ano de 2015 (PARA, 2019).

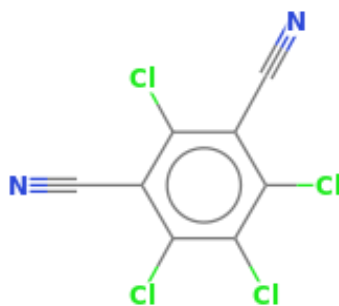
Diversos métodos analíticos foram desenvolvidos para análise de resíduos de parationa metílica, empregando diferentes técnicas de preparo de amostra e técnicas analíticas. A microextração líquido-líquido assistida por vórtex (VALLME) foi combinada com a microextração líquido-líquido dispersiva de baixa toxicidade (LT-DLLME) e análise por HPLC-UV para a determinação de cinco pesticidas organofosforados (isocarbophos, parationa metílica, triazophos, phoxim e clorpirifos-metil) em amostras de água, sendo o método desenvolvido aplicado em amostras ambientais (PENG *et al.*, 2015). O trabalho de Pano-Farias *et al.* (2018) utilizou a

cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) acoplado a espectrometria de massa em tandem (MS/ MS) para a determinação de parationa metílica e outros agrotóxicos em mamão e abacate, empregando QuEChERS como técnica de preparo de amostra.

No trabalho de Chen *et al.* (2018) um método de extração em ponteira descartável (*Disposable Pipette Extraction*, DPX) e detecção por cromatografia líquida de alta eficiência e detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) foi otimizado para a extração de parationa metílica e fention em alface, utilizando como fase extratora uma coluna monolítica híbrida de acrilóil β -ciclodextrina-sílica. Na China, a utilização de agrotóxicos organofosforados é muito alta, com isso, também utilizando microextração em fase sólida (SPME) e HPLC-UV, o trabalho de Huang *et al.* (2019) empregou polímeros molecularmente impressos (MIPs) para a determinação de cinco agrotóxicos organofosforados, entre eles a parationa metílica, em amostras de cevada, tomate, repolho, água do rio Xinjiang (China) e água de torneira.

O fungicida clorotalonil (2,4,5,6-tetraclorobenzeno-1,3-dicarbonitrila) é um agrotóxico organoclorado de benzeno substituído (**figura 3**) de fórmula molecular $C_8Cl_4N_2$, hidrofóbico e não ionizável, pertencente à classe química isoftalonitrila, que atua inibindo a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase nas células fúngicas, interrompendo o metabolismo, matando esses organismos (GAO *et al.*, 2019; ANVISA, 2022c). Recentemente sua utilização foi proibida na União Europeia e na Suíça, devido às suas propriedades cancerígenas, por apresentar riscos para os peixes e anfíbios e à contaminação de águas subterrâneas com seus produtos de transformação potencialmente tóxicos (KIEFER *et al.*, 2020).

Figura 3. Estrutura química do clorotalonil.



Fonte: National Institute of Standards and Technology (NIST, 2022c).

No Brasil, o fungicida é comercializado em 61 produtos com diferentes classificações toxicológicas, variando de altamente tóxico (classe II) a improvável de causar dano agudo (classe V) (AGROFIT, 2022). É permitido em 53 culturas como abóbora, alface, banana, cenoura, maçã, tomate e uva, onde o LMR (mg kg^{-1}) permitido varia entre 15,0, para o mamão, e 0,01, para milheto, milho e sorgo (ANVISA, 2022c). Algumas características e propriedades do clorotalonil são apresentadas na **tabela 3**.

Tabela 3. Características do agrotóxico clorotalonil.

Clorotalonil	
CAS	1897-45-6
Massa Molecular	265,91 g mol^{-1}
Solubilidade em Água	0,81 mg L^{-1} (25 °C)
LogP	2,94
Ingestão Diária Aceitável (IDA)	0,03 mg kg^{-1}

Fonte: SCIFINDER, 2021; LEISTRA; BERG, 2007; ANVISA, 2022c.

O clorotalonil é tóxico para organismos aquáticos, pássaros e humanos (inflamação de pele, olhos e distúrbios gastrointestinais) e considerado cancerígeno, com tempo de meia-vida na faixa de 17 e 70 dias no solo, sendo que já foi encontrado em até 1 ano após múltiplas aplicações (BACMAGA; WYSZKOWSKA; KUCHARSKI. 2018).

Alguns métodos analíticos têm sido desenvolvidos para o monitoramento de clorotalonil em diferentes matrizes, para ajudar a garantir a segurança alimentar e do meio ambiente. Uma modificação do método QuEChERS foi utilizada para determinar resíduo de clorotalonil em repolho mediante análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) (HOU; ZHAO; LIU, 2016). Um método rápido, simples e de baixo custo, utilizando a dispersão da matriz em fase sólida assistida por vórtex (VA-MSPD) e cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (GC-ECD), foi desenvolvido para a análise de clorotalonil, diclofluanida, DCOIT e TCMTB em tecidos de peixes (VIEIRA *et al.*, 2018).

Os produtos de degradação do clorotalonil também têm sido investigados, principalmente após a proibição desse agrotóxico pela União Europeia. Utilizando a extração em fase sólida (SPE) e QuEChERS, cinco metabólitos do clorotalonil foram determinados em solo e água subterrânea após o desenvolvimento de um método analítico empregando análise por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa em tandem (UHPLC-MS/MS) (HINTZE *et al.*, 2021).

Resíduos de agrotóxicos em pepinos consumidos na Turquia foram monitorados utilizando QuEChERS e análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS) ou cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em tandem (GC-MS/MS). Dos 109 resíduos analisados, 85 foram por cromatografia líquida e 24 por cromatografia gasosa, e os resíduos mais encontrados foram o clorotalonil (detectado em 32% das amostras) na faixa de concentração de 0,013-0,100 mg kg⁻¹, acetamipride (16,3%) e metalaxil (4,9%) (GOLGE; CINPOLAT; KABAK, 2021).

1.2 Frutas e suco de frutas

As frutas constituem uma parte considerável da dieta humana e são comumente consumidas como sucos, já que esse tipo de bebida é apreciada por toda a faixa etária da população mundial, principalmente em países tropicais, onde o consumo de líquidos é alto, além do mais, é considerada um alimento saudável, prático e nutritivo (RODRIGUES *et al.*, 2021).

A fruticultura brasileira ocupa cerca de 2 milhões de hectares, sendo que em 2021 o país foi o terceiro maior produtor de frutas do mundo, no qual a laranja e a banana corresponderam a grande parte do volume produzido (ABRAFRUTAS, 2021; RODRIGUES *et al.*, 2021). Uma parte significativa das toneladas de frutas colhidas é destinada as demandas internas e outra serve ao mercado mundial, em que o suco de laranja é o maior destaque, atendendo principalmente aos países norte-americanos e europeus (ABRAFRUTAS, 2021). Um comparativo da exportação de frutas entre os dois últimos anos relata que houve um aumento de 18% no volume vendido ao exterior no qual, entre as frutas mais exportadas, pode-se destacar as mangas, melões, uvas, maçãs, laranjas, morangos e abacaxis (ABRAFRUTAS, 2022a). Em relação ao consumo interno, segundo dados da POF/IBGE, em 2018 a banana manteve-se como a fruta mais consumida pelos brasileiros, seguida de laranja, melancia, maçã, mamão e abacaxi (HFBRASIL, 2021).

Aliado ao sabor refrescante, os sucos são ricos em nutrientes, compostos por diversas vitaminas, minerais, proteínas, aminoácidos, possuem baixo teor de gordura e fonte variada de antioxidantes protetores (CONIDI; CASTRO-MUÑOZ; CASSANO, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2021). O brasileiro, assim como a população global, está

buscando o consumo de alimentos mais saudáveis e naturais, aumentando o mercado de sucos sem adição de açúcar ou qualquer outro elemento na composição, priorizando assim apenas os sucos 100% fruta (INVESTSP, 2021). O suco de laranja é o mais popular, mas outros sucos têm ganhado popularidade devido aos seus notáveis benefícios à saúde, como os sucos a base de frutas vermelhas (DASENAKI; THOMAIDIS, 2019).

A produção de sucos aparece também como uma alternativa para agregar renda às produções industriais e familiares. Em 2018 a Embrapa trouxe o suco integral, polpas e fermentados de maçã como proposta para agregar valor aos frutos fora de padrão comercial, sendo o suco de maçã uma excelente fonte nutricional (EMBRAPA, 2018). A título de exemplo, no ano de 2021 o Brasil exportou mais sucos que propriamente as frutas *in natura*, ocupando o segmento de sucos a 25º posição nas exportações totais do país (2,42 milhões de toneladas), enquanto que as exportações de frutas e nozes ocuparam a 37º posição. Os principais compradores desse produtos são a Bélgica (31%), Países Baixos (25%) e Estados Unidos (25%) (COMEX STAT, 2022).

As frutas, assim como outras culturas agrícolas, sofrem com ataques de insetos, fungos e plantas daninhas, o que reduz a qualidade do produto e produtividade. Devido a isso, a aplicação de agrotóxicos ocorre nas lavouras, podendo resultar em resíduos nesses alimentos, que geralmente são consumidos crus ou utilizados para o preparo de bebidas. No caso de bebidas, durante o preparo a contaminação pode ocorrer tanto devido à fruta quanto a utilização de água contendo resíduos de agrotóxicos, resultando em um problema à saúde do consumidor (SUN *et al.*, 2019; CUNHA; FERNANDES; OLIVEIRA, 2009; SERESHTI, *et al.*, 2020).

Como já é sabido, os resíduos de agrotóxicos podem causar sérios problemas à saúde humana e eles já foram detectados em amostras de frutas e sucos de frutas (WANG *et al.*, 2021). Na literatura são encontrados diversos trabalhos voltados para a análise de agrotóxicos nessas matrizes (**tabela 4**).

Tabela 4. Estudos de determinação de agrotóxicos em sucos.

Analitos	Amostra	Técnica de extração/ análise	Meio de extração	Referência
Agrotóxicos Carbamatos	Suco de maçã, laranja e uva	MEPS/ HPLC-UV	RGO-ZnO	SUN <i>et al.</i> , 2019
7 Agrotóxicos Organofosforados	Suco de Laranja	SDME/ GC-FPD	Tolueno	ZHAO <i>et al.</i> , 2006
24 agrotóxicos	Suco de Maçã	DLLME/ MD-GC/ MS	Tetracloroeto de carbono	CUNHA; FERNANDES; OLIVEIRA, 2009
5 agrotóxicos de benzoilureia	Suco de toranja e limão; Chá verde e oolong.	UA- DLLME/ HPLC-UV	DES	LIU, <i>et al.</i> , 2020
7 agrotóxicos	Suco de maçã, abacaxi, pêsego, etc.	DSPE- DLLME/	Óxido de grafeno magnético funcionalizado/ DES	SERESHTI <i>et al.</i> , 2020
7 agrotóxicos	Suco de uva, pêra, romã, etc.	DSPE- DLLME/ GC-FID	Nanopartículas de carbono amorfo	FARAJZADEH <i>et al.</i> , 2020
7 agrotóxicos	Suco de laranja, romã, maçã e cereja azeda.	SPE- DLLME/ GC-FID	Papel filtro carbonizado/ 1,2 – dibromoetano	AGHDAM; FARAJZADEH; MOGADDAM, 2021

Em muitos países, os níveis máximos de resíduos (LMRs) são estabelecidos para os vegetais *in natura* e não para os produtos processados (CUNHA; FERNANDES; OLIVEIRA, 2009). Na instrução normativa nº 49, de 26 de setembro de 2018, o MAPA estabelece que é proibida, no suco e na polpa de fruta, a presença de “resíduo de agrotóxico não autorizado ou em concentrações superiores ao autorizado para a fruta ou para o vegetal empregado como matéria-prima na produção do suco”. A AIJN (*European Frut Juice Association*) relata sobre a presença de resíduos de agrotóxicos no suco em que, para assegurar o consumidor de qualquer risco a saúde, é garantido que a matéria-prima e o produto acabado atendam aos requisitos de limites máximos de resíduos já estabelecidos pela Comissão Europeia para agrotóxicos nos frutos (AIJN, 2010).

Na **tabela 5** são apresentados alguns dos resultados da última publicação do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), sendo que o programa não tem os sucos de frutas entre os alimentos analisados, mas as frutas *in natura* (principal matéria prima para a produção de sucos).

Tabela 5. Resultados por frutas do relatório PARA (2017-2018).

Frutas	Total de amostras	Nº de agrotóxicos detectados	Amostras irregulares com resíduo > LMR	Nº de agrotóxicos detectados NA	Nº de amostras com potencial de risco agudo
Abacaxi	347	28	28	18	1
Goiaba	283	43	18	115	8
Laranja	382	47	5	48	27
Uva	319	66	49	48	8
Manga	350	33	32	31	-

NA: agrotóxico não autorizado na cultura

Fonte: PARA, 2019.

O Plano Plurianual 2017-2020 do PARA tem o objetivo de analisar 11 frutas, que incluem as maçãs, uvas, morangos, laranjas entre outras. Durante agosto/2017 e junho/2018 foram coletadas 1.681 amostras de 5 culturas diferentes, sendo que 392 delas estavam fora das conformidades (**tabela 5**). Um destaque importante dos resultados, foram os 115 agrotóxicos não autorizados para a cultura de goiaba detectados, e as 27 amostras de laranja com potencial risco agudo de contaminação. Os resultados alertam para a importância da rastreabilidade dos resíduos, de modo a controlar riscos, garantir a qualidade dos produtos, prevenir e corrigir casos de risco potencial (PARA, 2019).

1.3 Métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos

Um método analítico envolve várias etapas para que a determinação, quantitativa e/ou qualitativa, dos analitos presentes na amostra forneça resultados de qualidade e confiáveis. De modo geral, em uma análise quantitativa, etapas como: seleção do método de análise, obtenção da amostra, processamento da amostra, eliminação de interferentes, cálculos dos resultados e estimativa da confiabilidade dos resultados são recorrentes (SKOOG *et al.*, 2006).

Com a ampla aplicação de agrotóxicos e a crescente internacionalização do comércio alimentício, a preocupação com a qualidade e segurança alimentar está

sempre em discussão e desenvolvimento (OLIVEIRA; LANÇAS, 2018). Os baixos limites máximos de resíduos (LMR) exigidos pelos órgãos regulamentadores de vários países e a alta concentração de compostos interferentes nas matrizes, demandam o desenvolvimento de métodos analíticos que envolvam uma preparação eficiente da amostra e a detecção e identificação em concentrações muito baixas dos analitos, sendo da ordem de parte por milhão a parte por trilhão (mg L^{-1} a ng L^{-1}) (BEYER; BIZIUK, 2008; OLIVEIRA; LANÇAS, 2018).

Para a determinação de resíduos de pesticidas em alimentos, muitos métodos de preparo de amostra podem ser empregados para a eliminação de interferentes inerentes à matriz, extração e pré-concentração dos compostos de interesse. Quando as determinações são realizadas por análises cromatográficas, a presença de interferentes pode trazer resultados falsos, devido a coeluição com os compostos de interesse, além de diminuir a vida útil das colunas analíticas e exigir a limpeza constante no sistema de injeção (BEYER; BIZIUK, 2008; JARDIM, 2010).

O preparo da amostra geralmente ocupa a maior porcentagem do tempo em análises químicas, tendo uma grande representatividade no custo final do método analítico e influenciando muito na confiabilidade dos resultados. Por esse motivo, técnicas de preparo de amostra e métodos de análise confiáveis e de baixo custo são necessários para a estimativa da contaminação humana e ambiental pelos agrotóxicos (MASIÁ; BLASCO; PICÓ, 2014).

O desenvolvimento de um método analítico universal para a análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos não é viável, pois muitos laboratórios dependem das técnicas analíticas disponíveis, o que leva a diferentes abordagens de preparo de amostra. Ou mesmo com a utilização de uma mesma técnica, diferentes possibilidades de equipamentos ou métodos instrumentais podem ser utilizados. Essa diversidade laboratorial e a disponibilização de orientações dos órgãos regulamentadores para a validação de métodos de análises, faz com que o desenvolvimento, por parte dos pesquisadores, de métodos analíticos seja contínuo (GRIMALT; DEHOUCK, 2016).

1.3.1 Técnicas de preparo de amostra

A escolha da técnica de preparo de amostra não é simples, assim como a sua otimização também não é, principalmente quando a análise envolve matrizes complexas como plasma, sangue, alimentos, extratos de plantas e amostras ambientais. O método de preparo de amostra deve ser o mais simples possível, com o menor número de etapas (menor introdução de erros e menor tempo de análise), seletivo (eliminação de interferentes), rápido, empregar instrumentações de baixo custo, permitir a automação, quando necessário, ser capaz de pré-concentrar o analito e consumir quantidades mínimas de reagentes e solventes, atendendo aos conceitos da química verde, conceito abordado desde o ano de 1991, que trata sobre sínteses, processamentos e usos de produtos químicos que reduzem os riscos impostos à saúde da população e ao meio ambiente como um todo (JARDIM, 2010).

Para a análise de alimentos as técnicas clássicas de preparo de amostra, como a extração em fase sólida (SPE) e a extração líquido-líquido (LLE) resultam em métodos, muito operosos e pouco indicados devido aos grandes volumes de solventes e amostra utilizados, elevado tempo de análise, possibilidade de formação de emulsão, uso de cartuchos não reutilizáveis e etapa de evaporação de um grande volume de solvente, resultando em alto custo com reagentes. Visto que a crescente preocupação com a segurança alimentar, aumenta o fluxo e o volume de amostras a serem analisadas, o interesse é direcionado para procedimentos rápidos, baratos e passíveis de automação (BARRIONUEVO; LANÇAS, 2001; BEYER; BIZIUK, 2008). Nesse sentido, o desenvolvimento de métodos miniaturizados baseados nas técnicas clássicas de preparo de amostra (SPE e LLE) tem crescido significativamente (BURATO *et al.*, 2020).

As técnicas miniaturizadas podem ser classificadas em duas categorias, as baseadas em sorventes e aquelas que utilizam um solvente como meio de extração, sendo que todas compartilham do contexto da química verde. Além disso, apresentam diversas vantagens como: procedimentos mais simples, menor consumo de solventes e amostra, uso de solventes de extração mais ecológicos, reutilização de fase sólida e possibilidade de automação (BURATO *et al.*, 2020; TOFFOLI; LANÇAS, 2015).

A introdução às técnicas miniaturizadas de preparo de amostra aconteceu em 1990 por Arthur e Pawliszyn, com a microextração em fase sólida (SPME), e outros trabalhos em 1996 (JEANNOT; CANTWELL, 1996; LIU; DASGUPTA, 1996) foram publicados utilizando um sistema miniaturizado de extração em fase líquida (LPME).

Atualmente as técnicas miniaturizadas mais utilizadas na análise de resíduos de alimentos são: microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME), microextração em fase sólida (SPME), extração sortiva em barra de agitação (SBSE), microextração em gota única (SDME) e microextração por sorvente empacotado (MEPS) (MARTINS *et al.*, 2021). Na **tabela 6**, estão representadas aplicações das técnicas miniaturizadas para a determinação de agrotóxicos em alimentos.

Tabela 6. Trabalhos empregando técnicas miniaturizadas para o preparo de amostra na determinação de agrotóxicos.

Análito	Amostra	Técnica miniaturizada	Técnica analítica	Referência
Agrotóxicos organofosforados e piretróides	Vegetais	DLLME	GC-MS	MAO <i>et al.</i> , 2020
7 herbicidas de triazina	Mel, tomate e água ambiental	HF-LPME	MEKC	YANG <i>et al.</i> , 2018
Pesticidas carbamatos	Maçã e pêra	HF-LPME	HPLC-DAD	MA <i>et al.</i> , 2014
28 pesticidas	Trigo	MEPS	UHPLC-MS/MS	OTTAVIO <i>et al.</i> , 2017
6 agrotóxicos	Caldo de Cana-de-açúcar	MEPS	GC-MS	FUMES <i>et al.</i> , 2016
6 fungicidas oxazol	Vinho e suco	SBSE	UPLC-DAD	VIÑAS <i>et al.</i> , 2008
Pesticidas organofosforados	Maças	SPME	GC-NPD	ZHANG <i>et al.</i> , 2019
4 fungicidas triazóis	Água e sucos	SPME	HPLC-UV	KADIVAR; ALIAKBAR, 2019
8 pesticidas organoclorados e organofosforados	Pepino e morango	HS-SDME	GC-ECD	KIN; HUAT, 2009

1.3.1.1 Microextração por sorvente empacotado (MEPS)

A técnica MEPS (do inglês *Microextraction by Packed Sorbent*) é uma miniaturização da SPE clássica baseando-se na química dos sorventes, em que as etapas de extração da amostra, pré-concentração dos analitos e limpeza são combinadas em um único dispositivo. Ao contrário da SPE, a fase extratora em MEPS é integrada a uma microseringa de manuseio de líquidos que permite a manipulação de amostras em volumes tão pequenos quanto 10 μL (ABDEL-REHIM, 2011; ARCOLEO; BIANCHI; CARERI, 2021).

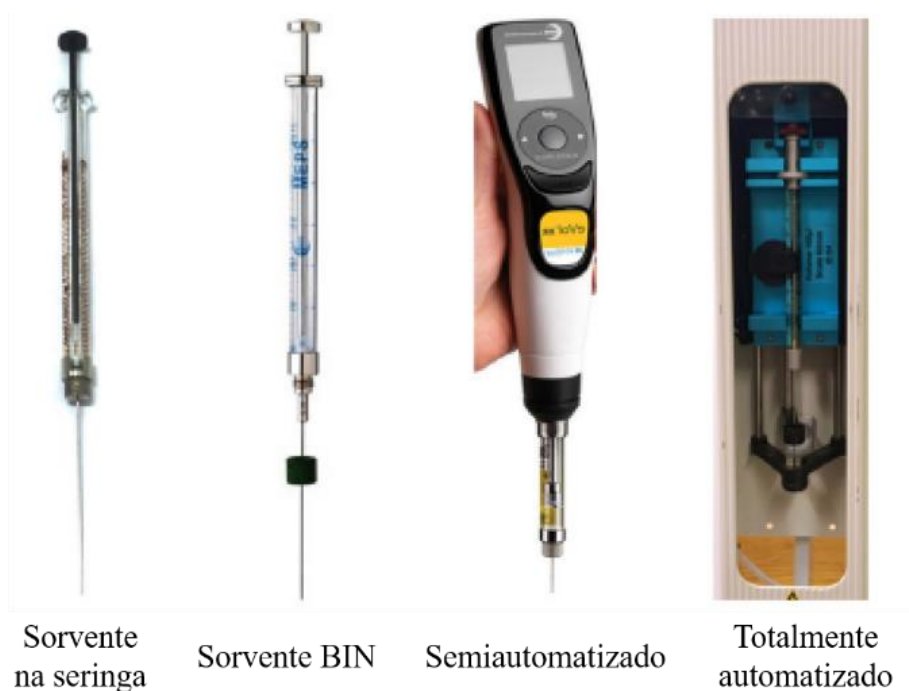
Em 2004 a técnica MEPS de preparação de amostras foi desenvolvida por Mohamed Abdel-Rehim (cientista da biofarmacêutica AstraZeneca, campus Södertälje/Suécia) e introduzida como uma técnica simples, rápida e que pode ser conectada em linha (on-line) para aplicação em cromatografia líquida e gasosa. Inicialmente foi idealizada para a determinação de anestésicos em amostras de plasma humano e apresentava diversas vantagens perante a SPME, sendo considerada a MEPS uma técnica mais robusta, que contornava os problemas com matrizes complexas apresentados pela SPME e alcançava uma recuperação de extração muito maior que as obtidas com SPME (ABDEL-REHIM, 2004; ALTUN; ABDEL-REHIM, 2008).

A técnica MEPS opera na ordem de microlitros utilizando seringas com volume de 100 μL a 500 μL , o que reduz o consumo de reagentes, amostras, solventes e massa de fase extratora. A fase extratora (1-5 mg) é depositada dentro de um cartucho localizado entre a agulha e o corpo da seringa ou em um microcartucho BIN (do inglês, *Barril Insert and Needle*) diretamente na agulha, de forma que o procedimento pode ser totalmente automatizado. A utilização de seringa permite a aspiração da amostra em vários ciclos, passando pela mesma fase sólida diversas vezes sempre em dois sentidos de fluxo. Um ciclo consiste em aspirar a amostra para dentro da seringa e dispensá-la, passando pela fase extratora, onde os analitos são sorvidos ocorrendo a extração (YANG; SAID; ABDEL-REHIM, 2017; LUIZ; MACIEL; LANÇAS, 2015).

Atualmente diferentes formatos para o dispositivo MEPS foram desenvolvidos, desde a microseringa clássica contendo o sorvente empacotado (dentro da seringa ou com o microcartucho BIN) às seringas semiautomáticas e totalmente automatizadas (**figura 4**). A utilização de microsseringas em MEPS possibilita a integração do preparo de amostra com o sistema analítico, o que torna simples a

automatização das etapas de processamento da amostra, extração e injeção no sistema de análise (YANG; SAID; ABDEL-REHIM, 2017; MOEIN; ABDEL-REHIM, A.; ABDEL-REHIM, M., 2015).

Figura 4. Diferentes formatos de dispositivos em microextração por sorvente empacotado (MEPS)



Fonte: Adaptado de MOEIN; ABDEL-REHIM, A; ABDEL-REHIM, M., 2015.

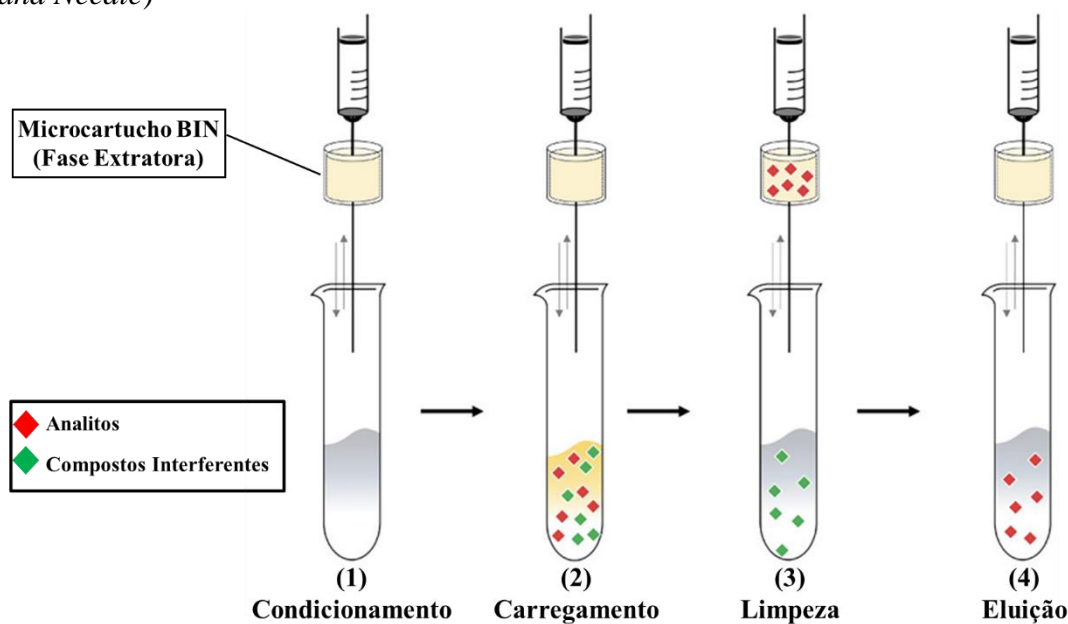
Recentemente um método automatizado para determinar canabinoides em urina humana foi desenvolvido utilizando um dispositivo MEPS e um amostrador automático feitos em laboratório. O microdispositivo para conter o material sorvente foi desenvolvido (BR1020130254517) e acoplado a uma seringa com porca metálica, sendo este microdispositivo de fácil montagem e desmontagem, que pode ser esvaziado e preenchido indefinidamente, o que possibilita a utilização de diferentes sorventes (comerciais ou feitos em laboratório) ampliando as possibilidades da técnica MEPS (SARTORE *et al.*, 2020). O dispositivo MEPS utilizado no trabalho de Sartore (2020) e colaboradores é o mesmo utilizado no desenvolvimento deste estudo.

Assim como todas as técnicas de microextração em fase sólida, na técnica MEPS uma grande parte da eficiência de extração e seletividade está relacionada com o material da fase extratora (fase sólida) utilizado. Os materiais mais empregados são a base de sílica, como C2 (etilsilano), C8 (octilsilano) e C18 (octadecilsilano). Outros materiais

estão sendo estudados, como polímeros molecularmente impressos (MIPs), líquidos iônicos e materiais à base de carbono (ANDRADE; SANTOS-NETO; LANÇAS, 2014; JORDAN-SINISTERRA; LANÇAS, 2021; SARTORE *et al.*, 2020). A separação dos compostos ocorre a partir de mecanismos de adsorção, partição, troca iônica e exclusão, envolvendo interações químicas e físicas, como ligação de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, dipolo induzido-dipolo induzido e interações iônicas. Portanto, os melhores resultados serão obtidos levando em consideração as características químicas dos analitos e da matriz em combinação com as propriedades da fase extratora (MACIEL *et al.*, 2019; JARDIM, 2010; LUIZ; MACIEL; LANÇAS, 2015).

A técnica MEPS possui as mesmas etapas presentes em SPE convencional, sendo elas: condicionamento da fase sólida, aspiração da amostra (carregamento da amostra), limpeza da amostra carregada e eluição da amostra. As quatro etapas são ilustradas na **figura 5**.

Figura 5. Ilustração das etapas do processo MEPS com microcartucho BIN (*Barril Insert and Needle*)



Fonte: Adaptado de BIRK *et al.*, 2021.

(1) Condicionamento - A primeira etapa do procedimento consiste na realização do condicionamento da fase sólida utilizando solventes, com o objetivo de limpar e também ativar a fase extratora liberando os sítios ativos para realizarem interações com o analito e/ou matriz e também deixar o material em um solvente de

características similares (força eluotrópica) ao solvente que contém a amostra/matriz (JARDIM, 2010; LUIZ; MACIEL; LANÇAS, 2015; ABDEL-REHIM, 2011).

(2) Carregamento da amostra - Após o condicionamento da fase extratora, é realizado o carregamento da amostra, no qual a amostra é puxada para cima e para baixo pela seringa várias vezes (ciclos) com o intuito que o analito permaneça aderido à fase extratora. Essa etapa é determinante na eficiência do método e deve ser realizada cuidadosamente (JARDIM, 2010; LUIZ; MACIEL; LANÇAS, 2015; ABDEL-REHIM, 2011).

(3) Limpeza – Nesta etapa é feita a limpeza da amostra carregada, que atua na remoção de interferentes pouco retidos. O solvente ideal é aquele capaz de remover os interferentes, porém não os analitos, sendo indicado o uso do próprio solvente que contém a amostra, ou uma mistura de solventes, como água e algum solvente orgânico (JARDIM, 2010; LUIZ; MACIEL; LANÇAS, 2015; ABDEL-REHIM, 2011).

(4) Eluição – Por fim, é realizada a eluição dos compostos que ficaram retidos na fase extratora para um frasco de coleta (off-line) ou diretamente para o equipamento de análise (on-line). Deve-se usar um volume pequeno de eluente, para que a solução eluída se encontre em concentração ideal para a análise; também é recomendada a utilização de um solvente, ou mistura de solventes, que possa estar acidificado ou basificado, ou que contenham uma força de eluição mais forte do que a do solvente utilizado na etapa anterior (limpeza da amostra) para que uma maior taxa de recuperação seja alcançada. Precisa ser compatível (volátil ou miscível) com a fase móvel do método cromatográfico que será utilizado (JARDIM, 2010; LUIZ; MACIEL; LANÇAS, 2015; ABDEL-REHIM, 2011).

Após a eluição dos compostos e antes da realização de uma nova extração (reutilização da fase extratora MEPS), a fase extratora deve ser limpa para diminuir ou eliminar o efeito de memória do método. Duas ou mais soluções de limpeza são indicadas, uma limpeza “forte” (solvente orgânico) e outra “fraca” (água/ água:solvente orgânico) para recondicionar o material. A solução de eluição pode ser utilizada como limpeza forte seguida por água, assim como, adicionar mais etapas de condicionamento ao método (ABDEL-REHIM, 2011).

O processo de desenvolvimento de um método MEPS envolve a avaliação de algumas variáveis experimentais que afetam o desempenho do procedimento. A remoção de macropartículas, assim como a diluição da amostra, podem ser necessárias para diminuir a viscosidade e evitar o entupimento do cartucho MEPS ou uma

contrapressão alta, assim como aumentar a sua vida útil; O ajuste do pH e da força iônica também podem ser avaliados; o número de ciclos de carregamento da amostra, aumentando a recuperação da extração; a velocidade com que a amostra passa pela fase extratora pode modificar as interações entre o analito e a fase extratora. Na etapa de limpeza, diferentes volumes de solvente podem ser avaliados, assim como diferentes porcentagens de mistura, que podem ser testados para avaliar a eficiência na remoção dos compostos indesejados. O solvente de eluição pode ser um composto orgânico (comumente metanol ou acetonitrila), puros ou misturados, de caráter ácido ou básico, capaz de remover todo o analito da fase extratora utilizando um pequeno volume. Outras etapas como, limpeza da fase extratora, também podem ser otimizadas (ABDEL-REHIM, 2011; MOEIN; ABDEL-REHIM, A.; ABDEL-REHIM, M., 2015).

1.4 Métodos cromatográficos e determinação de resíduos de agrotóxicos

Devido à facilidade com que efetua a separação, a cromatografia é destaque entre os métodos modernos de análise, pois é capaz de separar, identificar e quantificar as espécies químicas, por si só ou acoplada a outras técnicas analíticas (SILVA; COLLINS, 2011).

A separação cromatográfica ocorre baseada em processos físico-químicos, por distribuição entre duas fases, uma estacionária (sólida ou líquida) e outra móvel (um líquido, gás ou fluido supercrítico), que de forma seletiva provoca a migração diferenciada das espécies. Quando se inicia o procedimento cromatográfico, os analitos são arrastados pela fase móvel e entram em contato com a fase estacionária, e então eles se distribuem entre as duas fases, dependendo de suas afinidades relativas com as fases, o que depende das propriedades químicas e físicas do composto. Os analitos que possuem maior afinidade com a fase estacionária, irão permanecer mais retidos e com isso migram mais lentamente, enquanto os analitos de menor afinidade irão migrar mais rapidamente. Essa taxa de migração diferencial dos analitos resultará na separação dos componentes da mistura, conforme eles se movem pelo sistema (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; ROBARDS; HADDAD; JACKSON, 2004).

As separações em química analítica geralmente envolvem a utilização das duas técnicas cromatográficas mais conhecidas, a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acopladas a diferentes detectores. A

escolha da técnica que será utilizada depende das características do analito, principalmente da volatilidade e da polaridade. Substâncias voláteis e semivoláteis, não polares são frequentemente separadas por cromatografia gasosa. A cromatografia líquida (LC), é principalmente utilizada para separar compostos com polaridade mais alta (hidrofílicos) e pouco voláteis, ou ainda, elevada instabilidade térmica, que não foram derivatizados (SILVA; COLLINS, 2011; GOLGE; CINPOLAT; KABAK, 2021).

As duas técnicas cromatográficas (GC e HPLC) são muito utilizadas para a determinação de agrotóxicos em matrizes vegetais. Porém, devido a tendência na utilização de agrotóxicos mais polares, os quais apresentam menor persistência e toxicidade, a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência está sendo uma alternativa importante para a determinação de multirresíduos (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009). Os agrotóxicos pertencentes às classes químicas dos organofosforados, piretróides e compostos contendo nitrogênio, normalmente são analisados por métodos de GC. Por outro lado, sulfonil ou benzoilureias e muitos carbamatos ou triazinas são melhores separados por LC (GOLGE; CINPOLAT; KABAK, 2021). O diuron é um exemplo de agrotóxico não volátil que, para ser analisado por GC, precisa ser derivatizado por acilação ou metilação, hidrólise em sua anilina correspondente, entre outros. No entanto, se for empregando HPLC, que opera em condições de baixa temperatura, a decomposição térmica do diuron é minimizada e sua especificação em amostras ambientais é preservada (FIELD *et al.*, 1997).

O HPLC foi introduzido em 1970 e desde então promoveu grande progresso nas ciências analíticas. A utilização de fases estacionárias hidrofóbicas com fases móveis polares (cromatografia em fase reversa) ampliou a aplicação da técnica. Atualmente, cerca de 70% das separações de HPLC são realizadas no modo de fase reversa (GAMA *et al.*, 2012), sendo que as fases estacionárias mais utilizadas para a determinação de compostos orgânicos têm como base a sílica, contendo grupos octadecil e octil ligados quimicamente (C18 e C8). As fases móveis em fase reversa comumente, são compostas por misturas de acetonitrila e água ou metanol e água. A fase móvel deve ser ajustada para que a relação entre o fator de retenção (k), fator de separação (α) e o número de pratos ou eficiência (N), forneça uma resolução (R_s) suficiente para que ocorra a separação de todos os picos cromatográficos no mínimo tempo de análise (SILVA; COLLINS, 2011; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

No trabalho de Felício *et al.* (2016) o herbicida diuron e seus metabólitos foram determinados em amostras de solo utilizando análise por HPLC com detector UV

empregando uma coluna com fase estacionária C18. O modo de eluição isocrático foi adotado, utilizando como fase móvel uma mistura H₂O:ACN (55:45, v/v) com vazão de 0,86 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL e com detecção feita a 254 nm. A temperatura da coluna foi mantida em 30°C e o tempo total de análise foi de 11 minutos.

Outro trabalho utilizando HPLC-UV determinou diuron em amostras de água do solo de arroz, solo de arroz e mudas de arroz, empregando coluna C18, comprimento de onda de 250 nm, vazão de 0,8 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL. Para as amostras de água de solo de arroz, a fase móvel utilizada foi MeOH:H₂O (65:35, v/v) e para a análise do solo e mudas de arroz ACN:H₂O (40:60, v/v) foi empregada como fase móvel (LU *et al.*, 2019). A cromatografia líquida de alta eficiência foi acoplada a espectrometria de massas em tandem do tipo quadrupolo-tempo de voo (HPLC-QTOF-MS/MS), para a determinação de diuron em amostras de algas marinhas. O HPLC foi utilizado com coluna C18 e eluição gradiente binária consistindo de 0,10% de ácido fórmico em água ultrapura e acetonitrila com vazão de 0,60 mL min⁻¹. A temperatura do forno foi controlada em 30,0 °C, o volume de injeção foi de 10,0 µL e o tempo de análise, estimado pelo gradiente utilizado, foi de aproximadamente 20 minutos (TEKIN *et al.*, 2020).

A parationa metílica e a fentiona foram analisados em amostras de alface por HPLC-UV com coluna e pré-coluna C18, fase móvel MeOH:H₂O (80:20, v/v) com vazão de 1,0 mL min⁻¹. A temperatura da coluna foi mantida em 30°C e a detecção foi realizada em 267 nm (parationa metílica) e 243 nm (fentiona), volume de injeção de 20,0 µL (CHEN *et al.*, 2018). O trabalho de Seebunrueng, Santaladchaiyakit e Srijaranai (2015) utilizando HPLC-DAD determinou parationa metílica e outros agrotóxicos organofosforados em frutas. As condições cromatográficas envolveram a utilização de uma coluna C18 e eluição gradiente usando acetonitrila e água, com vazão de 1,0 mL min⁻¹ e detecção em 210 nm, com volume de injeção de 10 µL.

O trabalho de Yildiz e Çabuk (2018) determinou clorotalonil e outros dois fungicidas em suco de fruta, utilizando HPLC-UV com coluna C12, fase móvel compostas por ACN:H₂O (65:35, v/v), modo de eluição isocrático com vazão de 1,0 mL min⁻¹ e comprimento de onda de 250 nm.

Um sistema HPLC-MS/MS foi utilizado para detectar resíduos de clorotalonil e outros agrotóxicos em diversas amostras de frutas cítricas e vegetais. As condições de análises selecionadas, envolviam uma coluna cromatográfica C18, a fase móvel consistia em uma solução aquosa de ácido acético 0,1% e acetonitrila. A eluição

foi realizada em modo gradiente com vazão de 0,2 mL min⁻¹. O tempo final da análise foi de aproximadamente 55 minutos, pela descrição do gradiente realizado (AL-NASIR *et al.*, 2020).

1.5 Validação de métodos analíticos

O desenvolvimento de novas técnicas e métodos analíticos para a identificação e quantificação com segurança de analitos em amostras complexas (compostas por uma mistura de muitas substâncias diferentes), especialmente relacionadas a problemas ambientais ou proteção alimentar, é uma tendência da química analítica moderna. Contudo os resultados obtidos com o método analítico desenvolvido, estão sujeitos a erros, sejam eles sistemáticos ou aleatórios, os quais acabam diminuindo a acurácia do método. Neste sentido, para se garantir que um método analítico forneça resultados confiáveis, exatos e interpretáveis sobre uma amostra, ele deve passar por uma avaliação, denominada validação (TRULLOLS; RUISÁNCHEZ; RIUS, 2004; RIBANI; COLLINS; BOTTOLI, 2007; MAPA, 2011).

Não existem normas harmonizadas de validação estabelecidas de âmbito nacional ou internacional. No Brasil, há duas agências que disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos; A ANVISA, por intermédio da resolução RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017, e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) pelo documento DOQ-CGCRE-008, de março de 2003. O MAPA, por intermédio da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) e da Coordenação Geral de Apoio Laboratorial (CGAL), publicou um Manual de Garantia da Qualidade Analítica para o controle de resíduos e contaminantes em alimentos, para dispor de orientações consistentes dentro do cenário nacional e atender às exigências de qualidade dos resultados analíticos dentro do comércio mundial (MAPA, 2011; RIBANI *et al.*, 2004; RIBANI; COLLINS; BOTTOLI, 2007).

Na esfera internacional, a Comissão Europeia (*European Commission*, EC) é um dos órgãos reconhecidos e estabelece protocolos de controle de qualidade analítica e procedimentos de validação específicos para métodos de análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Outros órgãos regulamentadores reconhecidos internacionalmente são *United States Food and Drug Administration* (US-FDA), *Codex Alimentarius Commission* (CAC) e *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (RIBANI *et al.*, 2004; RIBANI; COLLINS; BOTTOLI, 2007). Assim, todos

esses órgãos (nacionais e internacionais) dispõem documentos orientativos para a validação de métodos analíticos, sendo um requisito fundamental para assegurar a qualidade e demonstrar a competência técnica, outorgando rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade aos resultados analíticos (RIBANI *et al.*, 2004; MAPA, 2011).

Os conceitos envolvidos na validação de métodos estão em constante evolução. A ANVISA define que validação é a “avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos”, com o objetivo de “demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos” (ANVISA, 2017).

1.5.1 Parâmetros analíticos

Os parâmetros analíticos (ou figuras de mérito) geralmente recorrentes para a validação de métodos de separação são: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez (RIBANI *et al.*, 2004; ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009).

Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado de seletivo, ou seja, a seletividade é o grau em que o procedimento analítico pode quantificar e/ou discriminar o analito na presença de outros analitos, matrizes ou de outro material potencialmente interferente (MAPA, 2011; INMETRO, 2020). Em um método instrumental de separação, a seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse sendo o primeiro passo no desenvolvimento e validação, pois este parâmetro analítico interfere diretamente na linearidade, exatidão e a precisão, e se não for assegurado, os resultados estarão seriamente comprometidos (RIBANI *et al.*, 2004). Para ensaios cromatográficos a matriz em branco não deve apresentar nenhum interferente significativo no tempo de retenção dos analitos e, caso coincida a eluição de algum composto, a resposta não deve ser superior a 20% do limite de quantificação do analito (CASSIANO, *et al.*, 2009; BANSAL; DESTETANO, 2007).

Ainda no estudo de seletividade é importante verificar se a presença das diversas substâncias que compõem a matriz afeta o sinal instrumental. Uma maneira efetiva de compensar um possível efeito dessas substâncias presentes na matriz no sinal instrumental é utilizar uma curva de calibração construída da matriz branca fortificada (MAPA, 2011; INMETRO, 2020; EUROPEAN COMMISSION, 2020).

A linearidade é a capacidade do método em produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma faixa de aplicação, ou seja, é possível construir uma curva de calibração por meio de um modelo matemático (geralmente uma equação de reta) que estabelece uma relação entre a resposta instrumental (ex.: área/altura da banda cromatográfica) e a concentração do analito. A faixa de aplicação é o intervalo entre a menor e a maior concentração do analito na amostra, para o qual, se demonstrou que o procedimento analítico tem um nível aceitável de exatidão, precisão e linearidade (INMETRO, 2020; MAPA, 2011; CASSIANO, *et al.*, 2009).

A curva de calibração é obtida por padronização interna ou externa, determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para concentrações conhecidas das espécies. A equação de reta ($y = bx + a$) relaciona o sinal instrumental com a concentração, sendo os coeficientes linear e angular (a e b) e o coeficiente de correlação (r) ou o coeficiente de determinação (r^2) gerados por meio do método matemático conhecido como regressão linear. Os coeficientes r e r^2 são parâmetros que permitem uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximos de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009).

A curva de calibração é construída a partir, no mínimo, de cinco análises de concentrações conhecidas do analito, sendo o limite inferior da faixa de concentração o valor do LQ, com no mínimo três replicatas em cada nível (EUROPEAN COMMISSION, 2020). Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados (RIBANI *et al.*, 2004), sendo que a ANVISA adota como critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação o valor de 0,990 (ANVISA, 2017). A Comissão Europeia também tem como critério de aceitação da curva de calibração, o cálculo do desvio entre a concentração teórica (concentração de fortificação) e a concentração experimental (concentração obtida com a curva de calibração) (EUROPEAN COMMISSION, 2020).

A exatidão e a precisão determinam os erros sistemáticos e aleatórios de uma medida analítica e são os principais critérios usados para julgar a qualidade de um método (CASSIANO, *et al.*, 2009). A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, sob condições definidas, medindo os erros aleatórios e pode ser avaliada em três níveis: repetibilidade (precisão intradia), precisão intermediária (precisão interdía) e reprodutibilidade (precisão interlaboratorial). Usualmente a precisão é expressa pelo coeficiente de variação (CV, usualmente expresso em porcentagem), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR) (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2020; ANVISA, 2017).

A repetibilidade representa a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo procedimento de medição, mesmo analista, mesma instrumentação, as mesmas condições de operação e o mesmo local, de modo que as diferenças nos materiais e equipamentos usados e/ou os analistas envolvidos não ocorram (EUROPEAN COMMISSION, 2020; MAPA, 2011; INMETRO, 2020). Pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição do analito ao branco da amostra, em várias concentrações na faixa de trabalho, de forma independente (inclui todas as etapas de preparo do processo de medição). Para avaliar a repetibilidade do método, o número mínimo de repetições para cada nível de concentração varia de acordo com os diferentes documentos de validação (INMETRO, 2020).

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do mesmo laboratório, sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, empregando o mesmo método, o mesmo local, mas alterando algumas ou uma combinação de fatores como: dias de análise, equipamentos, analistas e condições ambientais (INMETRO, 2020). O número necessário de ensaios e os critérios de aceitação para o DPR, geralmente seguem as mesmas recomendações para a avaliação da repetibilidade (ANVISA, 2017; EUROPEAN COMMISSION, 2020). A reprodutibilidade valida a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes, sendo estimada mediante a participação de um ensaio interlaboratorial colaborativo (MAPA, 2011). A verificação da reprodutibilidade normalmente é aplicada à padronização de métodos analíticos, por exemplo, para a inclusão de metodologia em farmacopeias (ANVISA, 2017).

A exatidão representa o grau de concordância entre o valor medido pelo método e o valor real aceito para um determinado analito em uma amostra, sendo determinada através da medida, em replicatas, de uma amostra com concentração conhecida do analito (INMETRO, 2020; RIBANI *et al.*, 2004). Existem diferentes

maneiras para avaliar a exatidão e alguns órgãos sugerem que seja determinada pela análise de 3 a 5 replicatas de uma mesma concentração, em pelo menos 3 concentrações diferentes (baixa, média e alta), cobrindo toda a faixa de uso do método (ANVISA 2017, MAPA, 2011; INMETRO, 2020). É recomendado o uso de materiais de referência certificados para aferir a exatidão, outra forma também aceita é a fortificação de uma matriz com uma quantidade conhecida do analito (SANTOS NETO, 2007). Na falta de uma matriz branco os ensaios podem ser feitos usando uma amostra com baixa concentração do analito (MAPA, 2011; INMETRO, 2020). A exatidão também pode ser avaliada pela comparação dos resultados fornecidos por outra técnica analítica com metodologia validada. Numericamente, a exatidão pode ser determinada através da relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra ou pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (ANVISA, 2017).

A exatidão do procedimento analítico deve estar compreendida dentro de intervalos especificados pelos órgãos regulamentadores, sempre associada a valores de precisão (MAPA, 2011; RIBANI *et al.*, 2004). A Comissão Europeia tem como critérios de aceitação para a exatidão, valores de recuperação média na faixa de 70-120%, com uma repetibilidade associada inferior ou igual a 20% (EUROPEAN COMMISSION, 2020).

O limite de detecção (LD) de um procedimento analítico é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada com segurança, mas não necessariamente quantificada, sob as condições estabelecidas para o ensaio. Existem diversos modos de se determinar o LD. O método visual baseia-se na análise de amostras com concentrações conhecidas de analito, realizando sucessivas diluições, até se encontrar a menor concentração que pode ser diferenciada do branco. Uma segunda abordagem para a determinação do LD é por intermédio da relação sinal/ruído, na qual são comparados os sinais medidos de amostra com baixas concentrações conhecidas do analito e dos ruídos dos brancos de amostras. Usualmente uma relação sinal/ruído de 3:1 ou 2:1 é considerada aceitável para determinar o LD. Também é possível realizar a estimativa do LD a partir da curva analítica pela equação: $LD = 3,3 \times S/b$, em que “s” é o desvio padrão da resposta do branco e “b” é o coeficiente angular da curva analítica (INMETRO, 2020).

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições

experimentais estabelecidas (ANVISA, 2017). De maneira análoga ao LD, o LQ pode ser determinado pelo método visual, sinal/ruído e pela curva analítica; sendo que a relação sinal/ruído típica para a estimativa do LQ é de 10:1 e a equação para o cálculo a partir da curva analítica é: $LQ = 10 \times s/b$, em que “s” é o desvio padrão da resposta do branco e “b” é o coeficiente angular da curva analítica (INMETRO, 2020).

A robustez é descrita pelo INMETRO como a capacidade de um método analítico em não ser afetado por pequenas variações nos parâmetros de execução do método (INMETRO, 2020). Muitas vezes a robustez é um parâmetro opcional no processo de validação, podendo ser avaliada durante o desenvolvimento do método, determinando a sua sensibilidade as pequenas variações nas condições analíticas. Alguns fatores que podem ser considerados nos ensaios de robustez englobam: estabilidade das soluções analíticas, diferentes fabricantes de solventes; na cromatografia líquida pode-se variar o pH da solução, temperatura, diferentes lotes ou fabricantes de colunas entre outros (INMETRO, 2020; ANVISA, 2017).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é apresentar o desenvolvimento de um método analítico empregando microextração por sorvente empacotado (MEPS) e cromatografia líquida acoplada a detector ultravioleta-visível (HPLC-UV/VIS) para a determinação dos agrotóxicos diuron, parationa metílica e clorotalonil em amostras de suco de maçã, abacaxi, morango, uva e caju.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Apresentar a otimização das condições de análise cromatográfica (qualitativa e quantitativa) por cromatografia líquida (HPLC-UV) para a análise dos agrotóxicos diuron, parationa metílica e clorotalonil;
- ✓ Apresentar a otimização do procedimento de extração e pré-concentração por MEPS, avaliando os fatores que afetam o desempenho do método: material sorvente utilizado como fase extratora, modo e volume de carregamento da amostra, número de ciclos de carregamento da amostra, solvente de eluição, volume de eluição, etapa de limpeza da amostra carregada;
- ✓ Apresentar os resultados de validação do método analítico desenvolvido (MEPS/HPLC-UV) e aplicação na análise de amostras comerciais de sucos.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e reagentes utilizados

Os padrões dos agrotóxicos diuron, parationa metílica e clorotalonil (grau de pureza 99,5%) foram fornecidos por Sigma Aldrich. A acetonitrila grau HPLC foi fornecida por Sal-R e o metanol grau HPLC foi fornecido por J. T. Baker. A água ultrapura foi obtida por meio do sistema *Ultrapure Water* (Merck, Millipore).

As soluções estoques dos agrotóxicos foram preparadas em acetonitrila a 540 mg L⁻¹ para diuron e clorotalonil, e a 560 mg L⁻¹ para parationa metílica e foram utilizadas para preparar soluções de trabalho, em diferentes concentrações, contendo a mistura dos compostos. As soluções de trabalho foram usadas para fortificar as amostras de suco de maçã usadas no desenvolvimento do método.

Os sorventes usados como fase extratora foram: sílica gel 60 (0,063-0,200 mm, Merck), Florisil[®] (60-100 mesh, Sigma-Aldrich), bondesil-C18 (40 µm, Agilent Technologies), bondesil-C8 (40 µm, Agilent Technologies), bondesil-CN-U (40 µm, Agilent Technologies) e bondesil-PSA (40 µm, Agilent Technologies).

Os equipamentos e materiais de uso comum em laboratório utilizados foram: papel filtro Qualy[®] com tamanho dos poros de 14 µm fornecidos por JProLab, membrana filtrante de nylon com tamanho dos poros de 0,45 µm, fornecidos por Allcrom, conjunto de filtração em vidro borossilicato, bomba de vácuo (B-740), balança analítica (AY220, Shimadzu), agitador de soluções - vórtex (AP56, Phoenix Lufenco), centrífuga para tubos (Quimis[®]), frascos de vidro (*vials*) com tampa septo e com tampa rosca, de diferentes volumes (Agilent Technologies), tubos Falcon (15 e 50 mL), frasco tipo eppendorf, balão volumétrico, erlenmeyer, béquer, proveta, pipeta volumétrica e graduada, micropipetador (20, 200 e 1000 µL), espátula e funil de vidro entre outros.

3.2 Instrumentação

Os agrotóxicos foram analisados em um cromatógrafo a líquido (HPLC) equipado com um detector UV-VIS (SPD-20A, Shimadzu), alça de amostragem (loop) de 20 µL, com forno para a coluna (CTO-20A, Shimadzu) e software para aquisição de dados (LC solution, Shimadzu). Foi utilizada uma coluna com fase estacionária octil (C8),

com 150 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e diâmetro da partícula de 5 μm . (Zorbax Eclipse Plus C8, Agilent Technologies). Também foi empregada uma pré-coluna C8 com as mesmas características (Zorbax Eclipse Plus C8, 12,5 mm x 4,6 mm x 5 μm , Agilent Technologies).

O modo de eluição empregado foi isocrático, utilizando metanol e água ultrapura, na proporção 62:38 (v/v), como fase móvel e vazão de 1,0 mL min^{-1} , com volume de injeção de 25 μL e controle de temperatura do forno mantida em 28,0 $^{\circ}\text{C}$. Os comprimentos de onda utilizados para a detecção foram 254 nm e 280 nm.

3.3 Preparo das amostras de suco de maçã

O suco de maçã, utilizado no desenvolvimento do método, foi preparado a partir de maçãs Fuji adquiridas no comércio da cidade de Catalão/GO. As maçãs foram raladas em ralador de inox e depois trituradas com mixer para obtenção de uma massa homogênea (polpa) que foi congelada.

Para a obtenção do suco, 6 gramas da polpa de maçã foram pesadas em um tubo Falcon de 50mL; a seguir foram adicionados 30 mL de água ultrapura. O tubo Falcon foi tampado e agitado por um minuto em vórtex. O suco de maçã foi centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado e filtrado três vezes com papel filtro (diâmetro de poro de 14 μm) e o filtrado foi ainda submetido a filtração à vácuo utilizando um conjunto de filtração de vidro contendo membrana de Nylon (diâmetro de poro de 0,45 μm), para a remoção de sólidos da amostra. Em seguida a amostra foi fortificada com os agrotóxicos antes da realização do procedimento MEPS.

3.4 Preparo das amostras de sucos comerciais

Suco de maçã de dois fabricantes diferentes foram usados. Cada suco comercial foi centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado e filtrado três vezes com papel filtro (diâmetro de poro de 14 μm) e o filtrado foi submetido a filtração à vácuo utilizando um conjunto de filtração de vidro contendo membrana de Nylon (diâmetro de poro de 0,45 μm). Em seguida a amostra sem diluição foi fortificada com os agrotóxicos e submetida ao método MEPS/HPLC-UV otimizado.

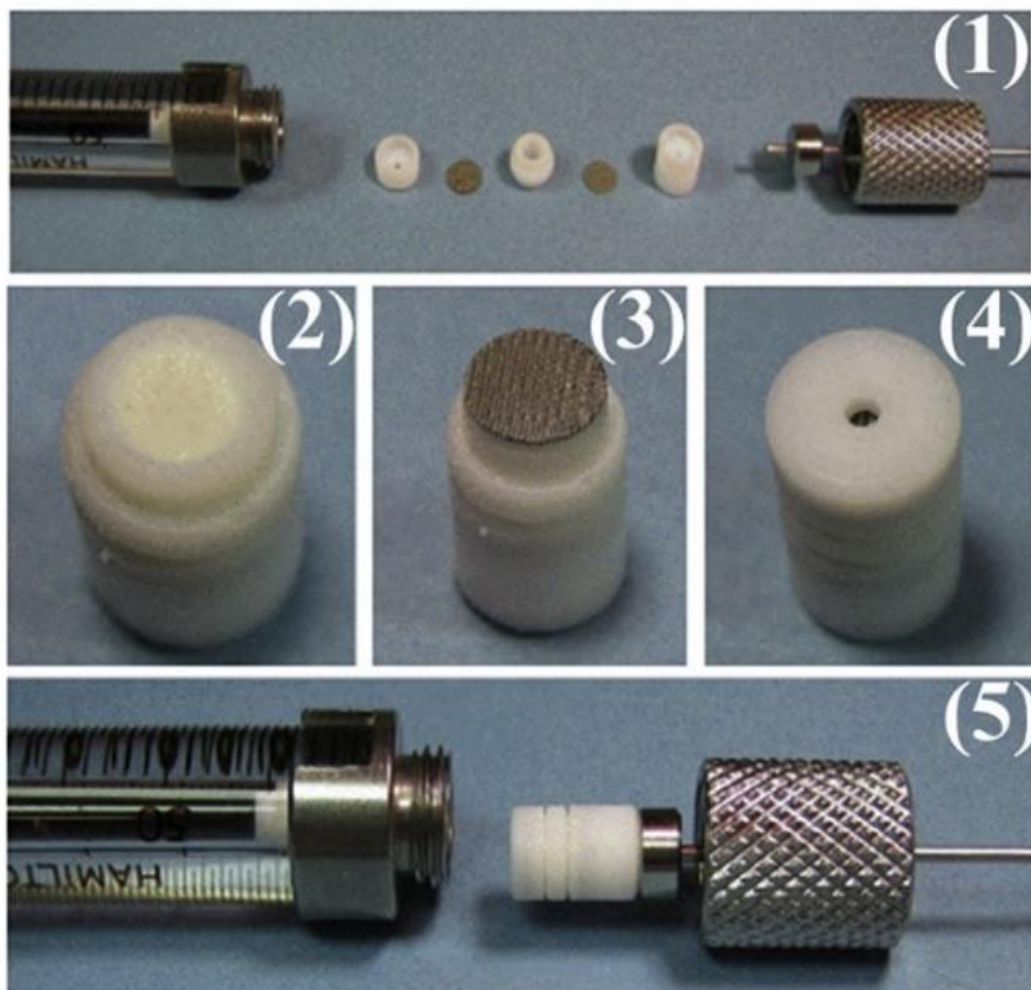
Os sucos comerciais de abacaxi, morango, uva e caju foram adquiridos na forma de polpas congeladas. Estes sucos foram preparados conforme orientado pelos fabricantes nas embalagens: um pacote de polpa de fruta comercial (100 g) foi batido com 300 mL de água filtrada, utilizando um liquidificador. Os sucos obtidos foram submetidos ao processo de centrifugação, filtração com papel filtro e depois filtrado pela membrana de Nylon, conforme descrito para as amostras de suco de maçã comerciais. Após a filtração os sucos foram fortificados com os agrotóxicos e o método MEPS/HPLC-UV otimizado e validado foi aplicado.

3.5 Dispositivo usado para MEPS

O dispositivo miniaturizado de preparo de amostra (dispositivo de extração), que foi acoplado a uma microsseringa, foi desenvolvido e patenteado (BR1020130254517) pelo Grupo de Cromatografia do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo (CROMA-IQSC/USP) e fornecido pelo Prof. Dr. Álvaro J. Santos Neto.

O microdispositivo é desmontável, reaproveitável e adaptado para uso em microsseringas de agulha removível. Conforme apresentado na **figura 6** ele é formado por três partes de politetrafluoretileno (PTFE) desmontáveis (**figura 6** (1)), sendo uma base, um corpo e uma tampa; e 2 filtros de aço inoxidável porosos (frit), utilizados para conter a fase extratora. Neste trabalho cerca de 5 mg do sorvente utilizado como fase extratora foram colocados no microdispositivo (**figura 6** (2) a (4)], que foi posicionado entre a microsseringa (modelo 1725RN, com agulha removível, volume: 500µL, HAMILTON) e a agulha por uma porca com rosca (**figura 6** (5)).

Figura 6. (1) Ilustração do microdispositivo de extração desmontado e da microseringa utilizados para MEPS. (2-4) Montagem do microdispositivo com a fase extratora empacotada. (5) Acoplamento do microdispositivo à seringa.



Fonte: Adaptado de SARTORE *et al.*, 2020.

3.6 Procedimento MEPS

A otimização do procedimento MEPS partiu de um método “padrão” descrita nas principais referências sobre MEPS (ABDEL-REHIM, 2011; MOEIN; ABDEL-REHIM, A.; ABDEL-REHIM, M., 2015; SUN *et al.*, 2019) composta pelas seguintes etapas: (1) limpeza da fase extratora, (2) condicionamento da fase extratora, (3) carregamento da amostra e (4) eluição dos analitos. O carregamento no dispositivo MEPS (etapa 3) foi realizado de duas maneiras:

(a) modo “aspirar e devolver”: consistiu em adicionar um volume fixo de amostra em um frasco. Esta alíquota foi aspirada e devolvida no mesmo frasco, sem descarte, por várias vezes (ciclos).

Descrição geral das etapas do procedimento MEPS (**figura 7**):

Etapa (1) **limpeza da fase extratora**: 200 μL de acetonitrila (ACN) foram aspirados e descartados seis vezes (modo “extrair-descartar” com seis ciclos);

Etapa (2) **condicionamento da fase extratora**: 200 μL de água ultrapura (H_2O) foram aspirados e descartados, duas vezes (modo “extrair-descartar” com dois ciclos);

Etapa (3) **carregamento da amostra**: 400 μL da amostra foram pipetados em um frasco de vidro (*vial*) e, a seguir, este volume foi aspirado e devolvido, por cinco vezes (modo “aspirar-devolver” com cinco ciclos);

Etapa (4) **eluição dos analitos**: 150 μL de ACN: H_2O (50:50, v/v) foram adicionados em um frasco eppendorf e, a seguir, este volume foi aspirado e devolvido no mesmo frasco por dez vezes (modo “aspirar-devolver” com dez ciclos);

As etapas de aspiração e descarte foram realizadas lentamente para obter uma boa interação entre a fase extratora e a amostra ou solvente e também para evitar a formação de bolhas (cavitação).

3.7 Otimização do procedimento MEPS

Todos os ensaios de otimização foram realizados em triplicata, com amostra de suco de maçã fortificada com diuron, na concentração de 0,2000 mg L^{-1} , parationa metílica e clorotalonil, ambos na concentração de 0,5000 mg L^{-1} .

As condições experimentais utilizadas no procedimento MEPS, nas etapas de limpeza e condicionamento da fase extratora (etapas 1 e 2) não sofreram modificações durante a otimização, sendo iguais para todos os testes realizados (**tabela 7**).

Tabela 7. Condições experimentais utilizadas no procedimento MEPS em todas as etapas de otimização.

Etapa do procedimento	Condição experimental usada
(1) limpeza da fase extratora:	200 μL de ACN x 6 ciclos
(2) condicionamento da fase extratora:	200 μL de água x 2 ciclos

Parâmetros experimentais das etapas de carregamento da amostra e eluição dos analitos (etapas 3 e 4) foram otimizados, e a realização da etapa adicional de limpeza da amostra carregada foi avaliada. Uma descrição resumida dos parâmetros que foram avaliados é mostrada a seguir e as condições experimentais usadas para avaliar cada parâmetro de otimização são mostradas nas **tabelas 8 a 14**.

(a) Parâmetros avaliados na otimização da etapa de amostragem:

- *Tipo de material utilizado como fase extratora:* foram testados os materiais C18 (octadecilsilano), C8 (octilsilano), florisil, sílica-gel 60, PSA (N-Propiletlenodiaminossilano), CN (cianopropilsilano). Para cada material, cerca de 5 mg foi adicionado ao dispositivo MEPS e as extrações foram realizadas conforme condições descritas na **tabela 8**.
- *Modo de carregamento da amostra:* foram testados os modos “aspirar-devolver” e “extrair-descartar” sendo que, para este último, o volume de amostra e a quantidade de ciclos de carregamento foi variada nos ensaios, conforme descrição apresentada na **tabela 9**.
- *Número de ciclos de carregamento:* foram testados 2, 4, 5 e 6 ciclos de carregamento com volume de amostra de 400 µL (por ciclo) e, também, 10 ciclos de carregamento com volume de amostra de 200 µL (por ciclo), conforme descrição apresentada na **tabela 10**.

(b) Parâmetros avaliados na otimização da etapa de eluição dos analitos:

- *Tipo de solvente utilizado para eluição:* acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e misturas destes solventes com água foram testados, conforme descrição apresentada na **tabela 11**.
- *Volume de solvente utilizado para a eluição:* 150 µL, 120 µL, 100 µL, 80 µL e 60 µL de ACN:H₂O (70:30, v/v) foram testados, conforme descrição apresentada na **tabela 12**.
- *Etapa adicional de limpeza da amostra carregada:* 3 ciclos foram testados com 100 µL de água ultrapura, conforme descrito na **tabela 13**.
- *Número de ciclos de eluição:* 8, 10 e 12 ciclos de eluição, empregando 60 µL de ACN:H₂O (70:30, v/v) foram testados, conforme descrição apresentada na **tabela 14**.

Tabela 8. Condições experimentais utilizadas no procedimento MEPS para a otimização da fase extratora.

Etapa do procedimento	Condição experimental usada
(3) carregamento da amostra:	400 µL de amostra x 5 ciclos (sem descarte, no mesmo frasco) Modo “aspirar-devolver”
(4) eluição dos analitos:	150 µL de ACN:H ₂ O (50:50, v/v) x 10 ciclos

Tabela 9. Condições experimentais utilizadas no procedimento MEPS para a otimização do modo de carregamento da amostra no dispositivo.

Etapa do procedimento	Modo de carregamento da amostra no dispositivo	
	“aspirar-devolver”	“extrair-descartar”
(3) carregamento da amostra: (fase extratora C18)	400 µL de amostra x 5 ciclos (sem descarte, no mesmo frasco)	(a) 100 µL de amostra x 4 ciclos (b) 200 µL de amostra x 2 ciclos (c) 200 µL de amostra x 4 ciclos (com descarte após cada ciclo)
(4) eluição dos analitos:	150 µL de ACN:H ₂ O (50:50, v/v) x 10 ciclos	150 µL de ACN:H ₂ O (50:50, v/v) x 10 ciclos

Tabela 10. Condições experimentais utilizadas no procedimento MEPS para a otimização do número de ciclos de carregamento da amostra no dispositivo.

Etapa do procedimento	Condição experimental usada	
(3) carregamento da amostra: (fase extratora C18 e modo “extrair-descartar”)	400 µL de amostra em: 2 ciclos 4 ciclos 5 ciclos	200 µL de amostra em: 10 ciclos
(4) eluição dos analitos:	150 µL de ACN:H ₂ O (50:50, v/v) x 10 ciclos	150 µL de ACN:H ₂ O (50:50, v/v) x 10 ciclos

Tabela 11. Condições experimentais utilizadas no procedimento MEPS para a otimização do tipo de solvente utilizado para eluição dos analitos.

Etapa do procedimento	Condição experimental usada
(3) carregamento da amostra: (fase extratora C18 e modo “extrair-descartar”)	200 µL de amostra x 10 ciclos
(4) eluição dos analitos:	150 µL dos seguintes solventes (x 10 ciclos): ACN (100%) ACN:H ₂ O (50:50, v/v) ACN:H ₂ O (70:30, v/v) MeOH (100%) MeOH:H ₂ O (70:30, v/v)

Tabela 12. Condições experimentais utilizadas no procedimento MEPS para a otimização do volume do solvente utilizado para eluição dos analitos.

Etapa do procedimento	Condição experimental usada
(3) carregamento da amostra: (fase extratora C18 e modo “extrair-descartar”)	200 µL de amostra x 10 ciclos
(4) eluição dos analitos:	ACN:H ₂ O (70:30, v/v) nos seguintes volumes: 150 µL x 10 ciclos 120 µL x 10 ciclos 100 µL x 10 ciclos 80 µL x 10 ciclos 60 µL x 10 ciclos

Tabela 13. Condições experimentais utilizadas no procedimento MEPS para a avaliação da etapa adicional de limpeza da amostra carregada.

Etapa do procedimento	Condição experimental usada
(3) carregamento da amostra: (fase extratora C18 e modo “extrair-descartar”)	200 µL de amostra x 10 ciclos
*Limpeza da amostra carregada	100 µL de água ultrapura x 3 ciclos
(4) eluição dos analitos:	60 µL de ACN:H ₂ O (70:30, v/v) x 10 ciclos

Tabela 14. Condições experimentais utilizadas no procedimento MEPS para a otimização do número de ciclos de eluição dos analitos.

Etapa do procedimento	Condição experimental usada
(3) carregamento da amostra: (fase extratora C18 e modo “extrair-descartar”)	200 µL de amostra x 10 ciclos
(4) eluição dos analitos:	60 µL de ACN:H ₂ O (70:30, v/v) x 8 ciclos 60 µL de ACN:H ₂ O (70:30, v/v) x 10 ciclos 60 µL de ACN:H ₂ O (70:30, v/v) x 12 ciclos

3.8 Procedimentos para validação do método

3.8.1 Seletividade

Para avaliar a seletividade, a amostra branco (suco sem os analitos de interesse) e a amostra fortificada (suco fortificado com os analitos de interesse na concentração de 0,05 mg L⁻¹) foram extraídas pelo método MEPS e analisadas.

3.8.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Para o estabelecimento do LD e LQ do método, amostras branco foram fortificadas em concentrações decrescentes, extraídas pelo método MEPS e analisadas. Para determinar a exatidão e a precisão, foram realizadas seis (6) réplicas no alvo LQ.

3.8.3 Linearidade

As curvas de calibração dos agrotóxicos foram construídas com nove níveis de concentração para o diuron (0,0100; 0,0150; 0,1500; 0,2500; 0,3500; 0,5000; 0,6500; 0,8000; 1,0000 mgL⁻¹), e com dez níveis de concentração para os agrotóxicos a parationa metílica e clorotalonil (0,0050; 0,0100; 0,0150; 0,1500; 0,2500; 0,3500; 0,5000; 0,6500; 0,8000; 1,0000 mgL⁻¹). Em cada nível de concentração da curva de calibração, foram realizadas duplicatas de extração usando o método MEPS.

A linearidade foi verificada pela construção da curva de calibração, colocando no eixo x as concentrações do analito e no eixo y as respostas das medições (área do pico cromatográfico). Aplicou-se a regressão linear adequada e obteve-se o coeficiente de correlação (r) e a equação de reta (**equação 1**).

$$y = bx + a \quad \text{(Equação 1)}$$

Em que:

y: área do pico cromatográfico;

x: concentração;

b: coeficiente angular;

a: coeficiente linear.

Para cada ponto da curva de calibração, o desvio entre a concentração teórica (concentração de fortificação) e a concentração experimental (concentração obtida com a curva de calibração) foi mensurado por meio do erro relativo percentual (*ER*, %), aplicando-se a **equação 2**. A concentração experimental média foi calculada por meio da equação de reta da curva de calibração, utilizando as áreas obtidas pelos padrões de calibração.

$$\text{Erro Relativo (ER, \%)} = \left(\frac{C_m - C_t}{C_t} \right) \times 100 \quad \text{(Equação 2)}$$

Em que:

C_m: Concentração experimental média;

C_t: Concentração teórica.

3.8.4 Exatidão e precisão

Para estimar a exatidão e a precisão do método, seis amostras foram fortificadas com os analitos na concentração de 0,0500 mg L⁻¹ e submetidas aos ensaios de extração MEPS, seguido de análise no HPLC-UV e este mesmo procedimento foi realizado para outros dois níveis de concentração (0,4000 e 0,7000 mg L⁻¹), sendo estes ensaios feitos em um único dia (exatidão e precisão intradia). Os mesmos ensaios (sextuplicatas de extração para cada concentração) foram repetidos em mais dois dias diferentes para avaliar a exatidão e precisão interdia. Nos ensaios interdia (precisão intermediária) também foram variados os microdispositivos MEPS utilizados nas extrações.

A precisão do método foi expressa como uma estimativa do desvio padrão relativo (DPR) conforme apresentado na **equação 3**, e a exatidão foi determinada pelo cálculo da recuperação (**equação 4**) (ANVISA, 2017).

$$\text{Desvio Padrão Relativo (DPR, \%)} = \left(\frac{DP}{C_m} \right) \times 100 \quad \text{(Equação 3)}$$

Em que:

DP: Desvio Padrão;

C_m: Concentração experimental média.

$$\text{Recuperação (R, \%)} = \left(\frac{C_m}{C_t} \right) \times 100 \quad \text{(Equação 4)}$$

Em que:

C_e: Concentração experimental média;

C_t: Concentração teórica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho visa o desenvolvimento de um método analítico empregando microextração por sorvente empacotado (MEPS) e cromatografia líquida acoplada a detector ultravioleta-visível (HPLC-UV/VIS) para a determinação de diuron, parationa metílica e clorotalonil em sucos de cinco frutas: maçã, abacaxi, morango, uva e caju. Considerando, então, que uma quantidade muito grande de ensaios precisaria ser realizada durante as etapas de otimização dos parâmetros envolvidos no desenvolvimento da técnica MEPS, optou-se por utilizar apenas uma, das cinco matrizes, nestas etapas. Assim, o suco de maçã foi escolhido como matriz representativa das demais, seguindo as recomendações e os agrupamentos de matrizes estabelecidos pelos órgãos regulamentadores (MAPA, 2011; EUROPEAN COMMISSION, 2020).

Para garantir que o método é aplicável às demais matrizes (suco de abacaxi, morango, uva e caju) e consolidar a validação, após o desenvolvimento e validação do método, foram realizados ensaios complementares de seletividade, recuperação e repetibilidade, para avaliar o comportamento do método para todas as matrizes (MAPA, 2011).

4.1 Análise dos agrotóxicos por HPLC-UV

As condições cromatográficas iniciais para a determinação dos agrotóxicos por cromatografia líquida, foram obtidas utilizando soluções padrão dos agrotóxicos. Com o objetivo de garantir uma boa resolução para os três compostos de interesse em um tempo satisfatório de análise, a separação foi avaliada em função de alguns parâmetros, como o tipo de fase estacionária, utilizando duas colunas cromatográficas (C18 e C8), seletividade da fase móvel (acetonitrila, metanol, água), força cromatográfica da fase móvel (diferentes proporções entre solvente orgânico e água), sensibilidade do detector para os agrotóxicos (diferentes comprimentos de onda) entre outros.

Nesta etapa inicial também foi necessário fazer um estudo sobre a seletividade da separação em relação à amostra de suco de maçã, para evitar a coeluição dos analitos com possíveis componentes da matriz, no mesmo tempo de retenção dos analitos.

Os parâmetros cromatográficos comumente utilizados para avaliação de desempenho (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006), como fator de separação (α), fator de retenção (k), resolução (R_s), tempo da análise cromatográfica, área/altura do pico, consumo de solvente e tempo de análise, foram considerados para a escolha da melhor condição cromatográfica.

As condições operacionais que proporcionaram uma boa separação dos compostos, em um tempo adequado de análise foram descritas na **seção 3.2**. A **figura 8** mostra o cromatograma da mistura de padrões dos agrotóxicos, utilizando as condições cromatográficas estabelecidas para o método. Os compostos diuron e clorotalonil apresentaram melhor sensibilidade quando 254 nm foi selecionado como comprimento de onda para a detecção UV, já a parationa metílica foi melhor detectada no comprimento de onda de 280 nm. Sendo assim, os dados quantitativos destes compostos foram coletados para o comprimento de onda mais sensível.

Amostras de suco de maçã sem adição dos agrotóxicos também foram analisadas nesta etapa e nenhum composto da matriz foi observado no tempo de retenção dos compostos (**figura 9**).

Figura 8. Cromatograma, obtido por HPLC, da mistura de padrões: **1** - diuron 0,2000 mg L⁻¹ ($t_R = 5,4$ min); **2** - parationa metílica 0,5000 mg L⁻¹ ($t_R = 6,7$ min); **3** - clorotalonil 0,5000 mg L⁻¹ ($t_R = 8,1$ min).

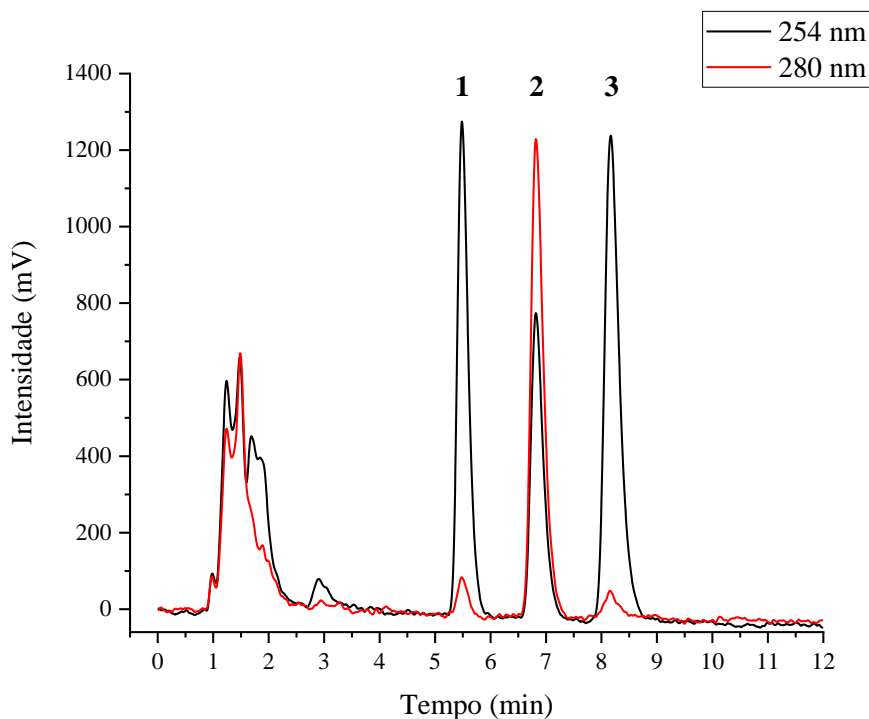
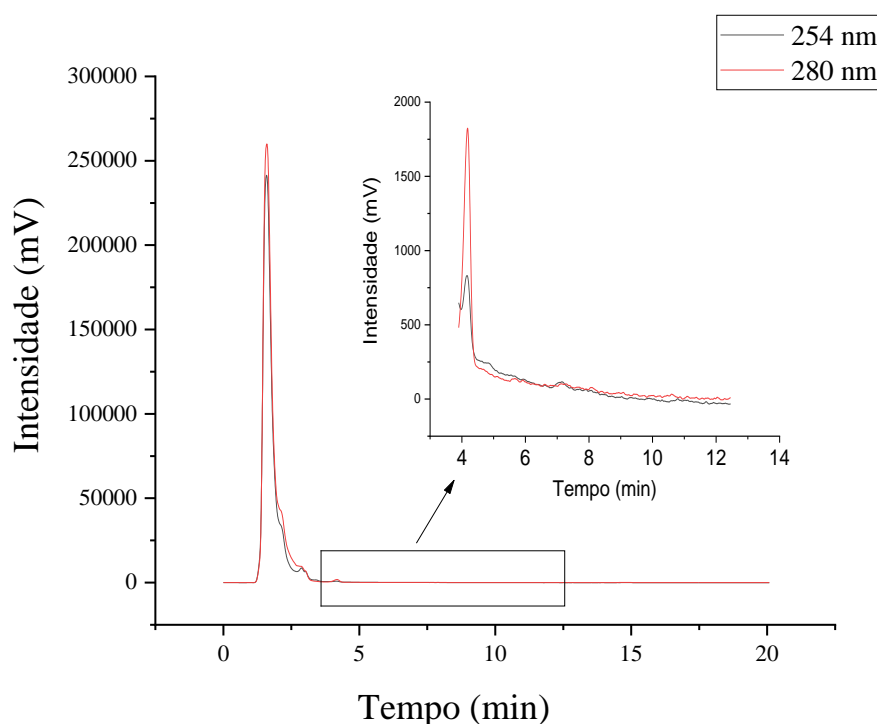


Figura 9. Cromatograma, obtido por HPLC, para a amostra de suco de maçã.



4.2 Otimização do procedimento MEPS

Para a extração e pré-concentração dos agrotóxicos diuron, parationa metílica e clorotalonil no suco de maçã pela técnica de microextração por sorvente empacotado (MEPS), algumas variáveis experimentais do procedimento foram avaliadas.

Assim, determinadas modificações foram introduzidas nas etapas de carregamento da amostra e eluição dos analitos com a finalidade de alcançar um melhor desempenho para o procedimento. Na etapa de amostragem, os parâmetros avaliados foram o tipo de material utilizado como fase extratora, o modo de carregamento da amostra e o número de ciclos de carregamento. Na Etapa de eluição dos analitos, os parâmetros avaliados foram: tipo e volume de solvente utilizado para eluição, e número de ciclos de eluição. Também foi avaliada a etapa de limpeza da amostra carregada, realizada durante o procedimento MEPS, incluída após a etapa de carregamento da amostra e antes da etapa de eluição. A descrição detalhada dos parâmetros avaliados foi mostrada na **seção 3.7**.

O desempenho de cada parâmetro testado foi mensurado por intermédio do fator de concentração (**equação 5**), que compara a área de cada composto após o procedimento MEPS com a área da solução padrão do composto. Assim, quanto maior o FC, melhor será a eficiência do procedimento MEPS.

$$\text{Fator de concentração (FC)} = \frac{\text{Área do composto após MEPS}}{\text{Área da solução padrão do composto}} \quad \text{(Equação 5)}$$

4.2.1 Otimização da etapa de amostragem

Na etapa de amostragem, os parâmetros avaliados foram o tipo de material utilizado como fase extratora, o modo de carregamento da amostra e o número de ciclos de carregamento. A descrição detalhada dos parâmetros avaliados foi mostrada na **seção 3.7**.

4.2.1.1 Seleção do material utilizado como fase extratora

O MEPS é uma técnica de extração que emprega fases sólidas (sorvente ou fase extratora) que partilham dos mesmos mecanismos de retenção (partição e/ou adsorção) envolvidos em cromatografia líquida em coluna. O tipo de fase sólida utilizada define a seletividade de extração do método e assim exerce muita influência no processo, pois diferentes interações reversíveis podem ocorrer dependendo da estrutura química do analito, das propriedades do sorvente e da composição da matriz da amostra (JARDIM, 2010; YANG; SAID; ABDEL-REHIM, 2017).

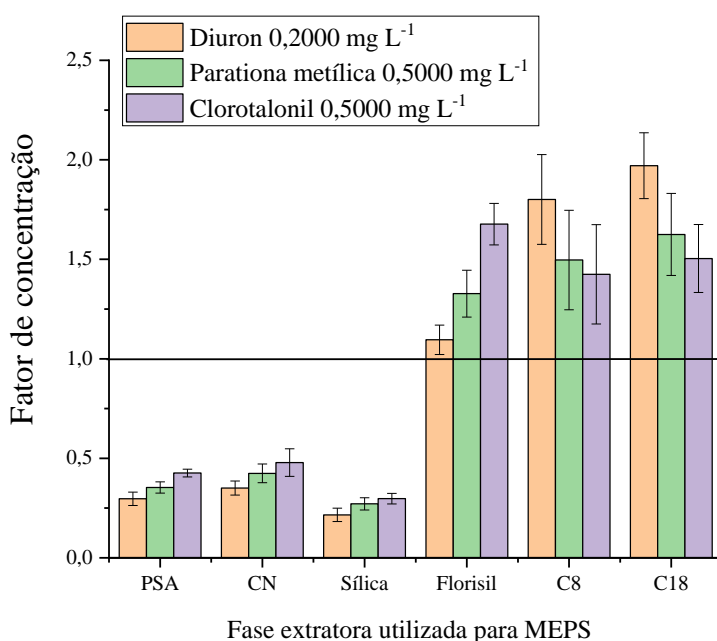
Assim, seis materiais sorventes comerciais foram avaliados como fase extratora. As fases apolares com grupos alquilas C8 (octil) e C18 (octadecil) de sílica quimicamente ligada, apresentam propriedades semelhantes sendo que a diferença principal está na menor carga carbônica da C8, que apresenta cadeia de hidrocarbonetos mais curtas, o que a torna menos retentiva para compostos apolares. Essas duas fases são ideais para analitos com grupos funcionais apolares como alquilas e aromáticos, contidos em matrizes polares. Os sorventes ciano (cianopropilsilano), florissil, PSA (N-Propiletilenodiaminossilano - amina primária secundária) e sílica possuem caráter polar

ou moderadamente polar. O ciano (CN) é um adsorvente de polaridade média, indicado para a extração de compostos polares de matrizes apolares, ou compostos extremamente apolares de matrizes aquosas. O PSA é um material constituído de amina alquilada com uma amina primária e outra secundária, indicada para compostos polares, que possui uma capacidade iônica e apresenta uma carga carbônica maior do que a maioria dos sorventes funcionais de amino. A sílica gel e o florisil são polares e possuem características similares sendo indicados para a extração de compostos polares, como analitos que possuem grupos funcionais polares por exemplo aminas e hidroxilas (JARDIM, 2010; YANG; SAID; ABDEL-REHIM, 2017; AGILENT, 2021).

Os resultados obtidos após a realização do procedimento MEPS com as seis fases extratoras, são apresentados na **figura 10**.

As fases extratoras sílica, PSA e CN forneceram resultados muito similares e não foram capazes de extrair os agrotóxicos, visto que as respostas cromatográficas (área do pico cromatográfico) obtidas após o MEPS para os três analitos foram menores que as obtidas para o controle, resultando em valores inferiores a 1,0 para o fator de concentração. As fases extratoras florisil, C8 e C18 apresentaram ótimos resultados de extração e pré-concentração. Para o clorotalonil, os três materiais forneceram fatores de concentração entre 1,4 e 1,7. Já os melhores resultados para a parationa metílica e diuron foram obtidos utilizando as fases extratoras C8 e C18.

Figura 10. Fator de concentração médio (n=3) dos compostos usando MEPS com diferentes fases extratoras.



Entre as seis fases extratoras analisadas, C8 e C18 apresentaram os melhores resultados de forma conjunta para os três agrotóxicos analisados. Os fatores de concentração obtidos após o MEPS com C8 foram aproximadamente 1,8 para o diuron, 1,5 para a parationa metílica e 1,4 para o clorotalonil. Quando C18 foi utilizado, os valores para o fator de concentração do diuron, da parationa metílica e do clorotalonil foram, respectivamente 2,0, 1,6 e 1,5. Quando utilizado C18, a repetitividade das extrações (n=3) foram melhores, com os valores de desvio padrão relativo (DPR) variando entre 8,4 e 12,7%. Desta forma, a fase extratora C18 foi escolhida para o prosseguimento da otimização.

4.2.1.2 Seleção do modo de carregamento da amostra

O modo de carregamento “aspirar-devolver” foi utilizado na etapa anterior deste estudo, para a seleção da fase extratora apresentando resultados satisfatórios (fatores de concentração entre 1,5 e 2,0 para os agrotóxicos), no entanto, devido às baixas concentrações em que esses compostos são permitidos nas matrizes alimentícias, mais testes são necessários com o intuito de obter um desempenho melhor na pré-concentração. Assim, um outro modo de carregamento de amostra foi avaliado: “extrair-descartar”.

Os dois modos de carregamento apresentam vantagens e desvantagens na etapa de amostragem, relacionadas aos resultados obtidos para recuperação, repetitividade, tempo de análise, estresse mecânico e vida útil da seringa MEPS (QUINTO *et al.*, 2014; PRIETO *et al.*, 2011; ABDEL-REHIM, 2011).

Nas seções 1.3.1.1 e 3.6 são fornecidas informações a respeito dos modos “aspirar-devolver” e “extrair-descartar”. De maneira sucinta, no modo “aspirar-devolver”, a amostra contida em um frasco é aspirada e dispensada no mesmo frasco múltiplas vezes (ciclos) e no modo “extrair-descartar”, um volume fixo da amostra é aspirado e dispensado em um descarte múltiplas vezes.

Assim, utilizando C18 como fase extratora, foram realizados testes com os dois modos de carregamento nas condições descritas a seguir:

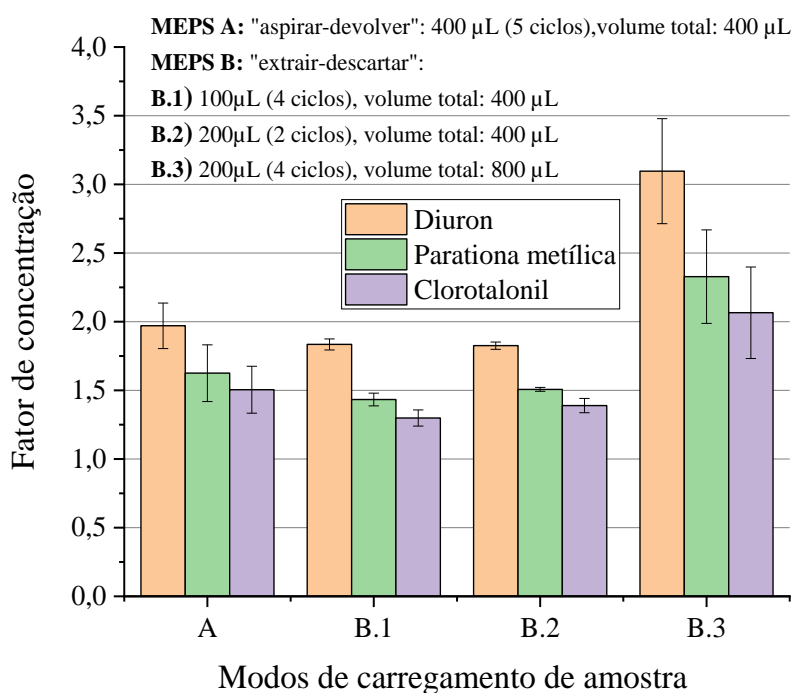
1. Limpeza do sorvente: 200 μL de ACN (6 ciclos);
2. Condicionamento do sorvente: 200 μL de água (2 ciclos);
- 3. Carregamento da amostra (“modo de carregamento”): ***
4. Eluição: ACN:H₂O (50:50) - 150 μL (10 ciclos).

* MEPS modo “aspirar-devolver”: 400 μL (5 ciclos), volume total de amostra: 400 μL ;

* MEPS modo “extrair-descartar”: 100 μL (4 ciclos), volume total de amostra: 400 μL ;
 200 μL (2 ciclos), volume total de amostra: 400 μL ;
 200 μL (4 ciclos), volume total de amostra: 800 μL ;

Os resultados são ilustrados na **figura 11** e mostram que, para um mesmo volume de amostra (400 μL), o fator de concentração obtido nos modos “extrair-descartar” (B.1 e B.2 na **figura 11**), foram semelhantes ao obtido no modo “aspirar-devolver” (A na **figura 11**).

Figura 11. Fator de concentração médio ($n=3$) dos compostos nos modos de carregamento (A) “aspirar-devolver” e (B) “extrair-descartar”, usando MEPS com fase extratora C18.



Alguns trabalhos, como o dos autores Silveira *et al.* (2020), mostram que no modo “aspirar-devolver” quanto maior o volume de amostra, menor será a eficiência de extração para um mesmo número de ciclos, ou seja, quando há um aumento no volume de amostra se faz necessário acrescentar mais ciclos de extração no método, de modo a maximizar o contato do analito com o material sorvente. Embora a utilização de maiores volumes de amostra, aumente a massa de analitos que passa pela fase extratora, o que melhora a pré-concentração dos compostos, para o modo “aspirar-devolver” não é interessante, pois será necessário o aumento de ciclos de extração, acrescentando no tempo de preparo de amostra, aumentando o estresse mecânico da seringa MEPS. Para o modo “extrair-descartar” os resultados mostram que com o dobro de volume de amostras (800 μL), carregado com 4 ciclos de 200 μL , as áreas dos compostos aumentaram significativamente, quando comparadas com a área média para os 5 ciclos de 400 μL realizados no modo “aspirar-devolver.

Pelos motivos apresentados, o modo “extrair-descartar” foi o mais eficiente especialmente considerando o tempo de extração e rendimento de extração, pois com menor volume de carregamento (200 μL) e menos ciclos (4 ciclos) (**figura 11** (B.3)) forneceu melhores resultados que o outro modo avaliado (**figura 11** (A)), no qual foi empregado um volume de carregamento de 400 μL e 5 ciclos de extração; além de diminuir o desgaste mecânico da seringa MEPS, colaborando no prolongamento da vida útil do dispositivo. Outros trabalhos que utilizam a técnica MEPS partilham das mesmas observações apresentadas (PRIETO *et al.*, 2011; CAVALHEIRO *et al.*, 2013; MOEDER *et al.*, 2010; QUINTO *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2019).

4.2.1.3 Seleção do número de ciclos de carregamento da amostra

Com o intuito de selecionar o número de ciclos de carregamento mais adequado ao método no modo “extrair-descartar”, em termos de desempenho e praticidade na execução, foram realizados testes com o volume de carregamento de 400 μL em 2, 3, 4 e 5 ciclos e, adicionalmente com volume de carregamento de 200 μL em 10 ciclos.

Estes testes foram realizados utilizando a fase extratora C18 com o modo de carregamento selecionado na etapa anterior (“extrair-descartar”). Desse modo conforme o número de ciclos de extração varia, o volume total de amostra que é

submetida ao processo de extração também é variado. Assim, para facilitar a discussão, uma breve descrição é apresentada a seguir para mostrar o volume total de amostra utilizado em cada ensaio (as condições experimentais destes ensaios foram descritas na **tabela 9 da seção 3.7**):

1. Limpeza do sorvente: 200 μL de ACN (6 ciclos);
2. Condicionamento do sorvente: 200 μL de água (2 ciclos);
- 3. Carregamento da amostra** (“extrair-descartar”): *
4. Eluição: ACN:H₂O (50:50) - 150 μL (10 ciclos).

* MEPS modo “extrair-descartar”:

400 μL da amostra (2 ciclos), volume total de amostra: 800 μL ;

400 μL da amostra (3 ciclos), volume total de amostra: 1200 μL ;

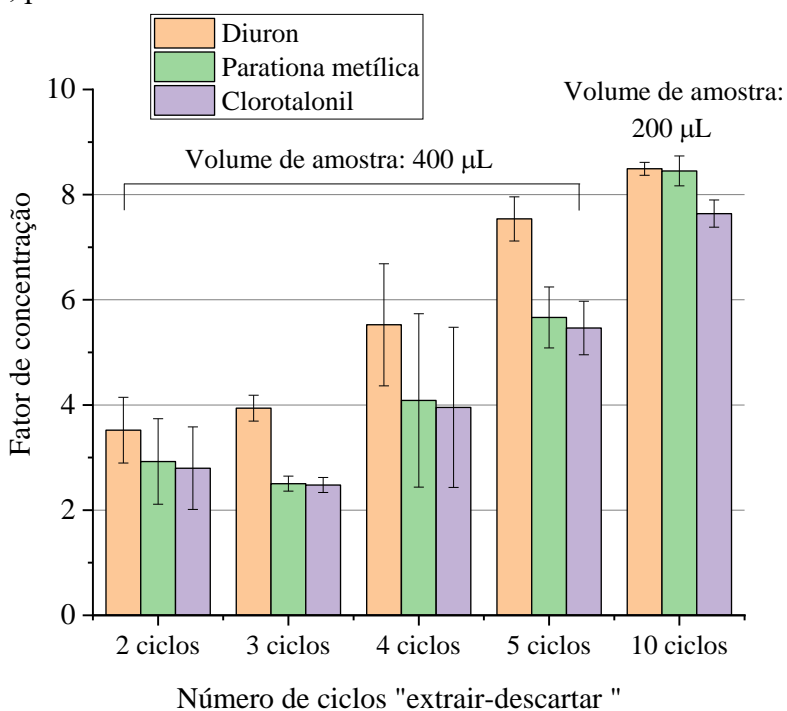
400 μL da amostra (4 ciclos), volume total de amostra: 1600 μL ;

400 μL da amostra (5 ciclos), volume total de amostra: 2000 μL ;

200 μL da amostra (10 ciclos), volume total de amostra: 2000 μL ;

Os resultados obtidos são mostrados na **figura 12**.

Figura 12. Fator de concentração médio (n=3) dos compostos usando MEPS com fase extratora C18, para diferentes números de ciclos “extrair-descartar”.



O fator de concentração dos compostos aumentou significativamente com o aumento do número de ciclos de carregamento da amostra. Para o volume de 400 μL , quando realizados 2 ciclos de carregamento, o fator de concentração médio dos compostos foi superior a 2,8 e quando este número aumentou para 5 ciclos, os fatores de concentração para diuron (7,5), parationa metílica (5,7) e clorotalonil (5,5) foram ainda maiores. Esse aumento está relacionado com a quantidade de massa de analito aspirada, que aumenta com o acréscimo de ciclos de carregamento quando utilizado o modo “extrair-descartar”.

Embora os fatores de concentração obtidos quando se utilizou 400 μL de amostra em 5 ciclos (volume total de amostra de 2000 μL) tenham sido muito satisfatórios, um aspecto experimental importante observado foi que a seringa fica quase completamente preenchida nesta condição, tornando o processo de aspiração da amostra mais demorado. Assim, um teste adicional foi realizado, diminuindo o volume de carregamento para 200 μL e aumentando o número de ciclos para 10, de modo que o volume total de amostra aspirada (2000 μL de amostra) seja o mesmo que na condição anterior (400 μL em 5 ciclos). Como observado (**figura 12**), na prática a realização de mais ciclos de carregamento com um volume menor resulta em melhores resultados de extração (fator de concentração maior) e menores coeficientes de variação entre as extrações, quando comparados com a realização de menos ciclos de carregamento com volumes maiores. Essa melhora experimental já foi relatada por autores que utilizam a técnica de extração líquido-líquido (JARDIM, 2010; SOARES *et al.*, 2015) e Lanças (2004) relata essa observação na etapa de eluição na SPE.

4.2.2 Otimização da etapa de eluição dos analitos

A otimização da etapa de eluição dos compostos sorvidos na fase extratora (solvente, volume e ciclos de eluição) garante a dessorção eficiente dos compostos de interesse.

4.2.2.1 Seleção do tipo de solvente utilizado para eluição

O solvente utilizado na etapa de eluição deve ser capaz de interagir com os componentes da amostra e arrastá-los da fase extratora, deve possuir grau de polaridade semelhante ao da fase extratora utilizada (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Neste trabalho a fase extratora apolar C18 foi escolhida para o procedimento MEPS, com isso os solventes orgânicos mais adequados para interromper as interações hidrofóbicas e promover a eluição dos compostos são aqueles de caráter apolar. (SILVEIRA *et al.*, 2020; SOUZA; DOMINGUES; QUEIROZ, 2015; JARDIM, 2010).

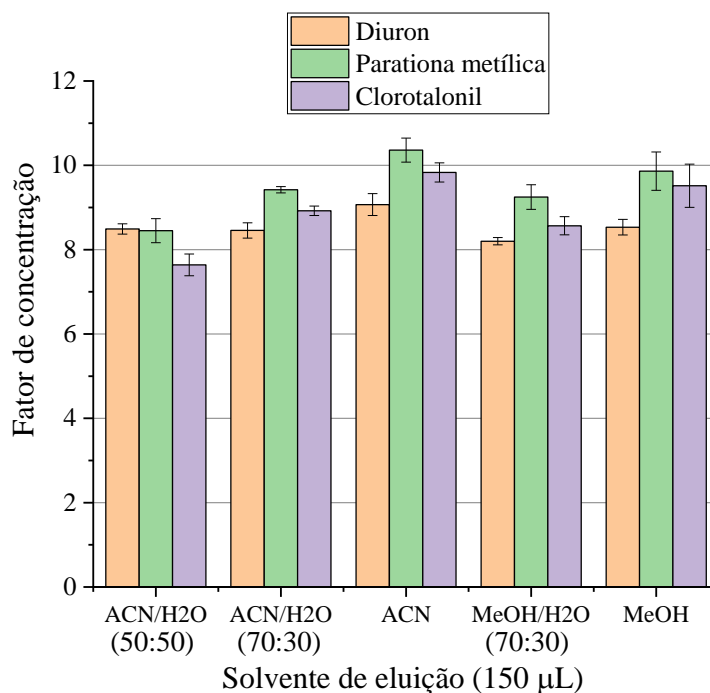
Nas etapas anteriores do estudo, a eluição dos analitos foi realizada com a mistura ACN:H₂O (50:50, v/ v) e, juntamente com os demais parâmetros selecionados para a extração, esta condição forneceu resultados muito satisfatórios (fatores de concentração acima de 7,6). No entanto, na tentativa de conseguir aumentar ainda mais o valor do fator de concentração, a porcentagem do solvente orgânico acetonitrila (ACN) foi aumentada para 70% e 100% e também foi avaliado o uso de metanol (MeOH) puro (100%) e sua mistura com água na proporção 70:30, v/v.

Os experimentos para a seleção do tipo de solvente utilizado para eluição dos analitos, foram feitos seguindo as etapas:

1. Limpeza do sorvente: 200 µL de ACN (6 ciclos);
2. Condicionamento do sorvente: 200 µL de água (2 ciclos);
3. Carregamento da amostra (“extrair-descartar”):
 - a. 10 ciclos x 200 µL (2000 µL de amostra)
- 4. Eluição: 150 µL (10 ciclos).**

Os resultados são mostrados na **figura 13**.

Figura 13. Fator de concentração médio (n=3) dos compostos usando MEPS com fase extratora C18 e eluição com diferentes solventes.



Quando ACN foi utilizada (pura ou misturas) observou-se um aumento discreto no fator de concentração do composto diuron (de 8,5 para 9,1), já para os compostos parationa metílica (de 8,5 para 10,4) e clorotalonil (de 7,6 para 9,8) esse aumento foi mais significativo. Quando foi utilizado MeOH puro, ou sua mistura com água, os fatores de concentração dos compostos foram similares aos observados quando se utilizou ACN, no entanto, foi observado maior repetibilidade nos ensaios em que a acetonitrila foi utilizada (menores valores para o desvio padrão relativo, DPR), em relação aos ensaios com uso de MeOH.

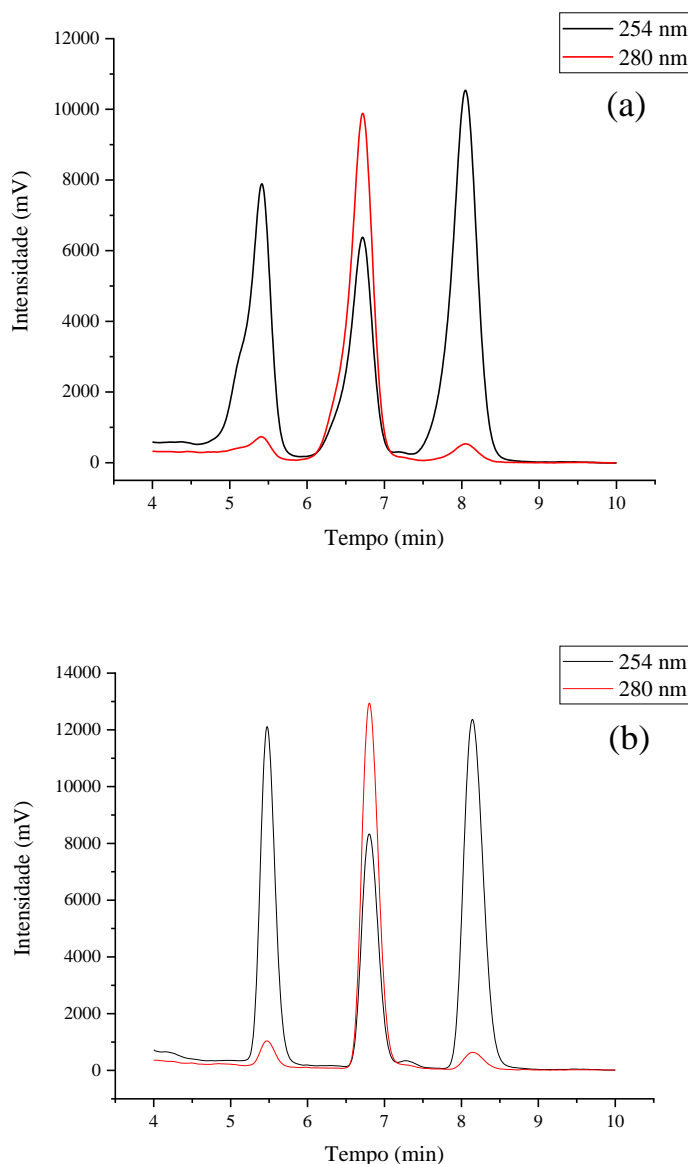
Assim, de acordo com os resultados, o melhor desempenho é obtido quando é utilizando acetonitrila pura (100%) na etapa de eluição (maiores fatores de concentração), no entanto, outros aspectos além do maior fator de concentração precisam ser considerados como, por exemplo, as condições adequadas para a introdução da amostra no sistema cromatográfico (HPLC).

Quando a eluição dos compostos é realizada em um solvente muito diferente da fase móvel utilizada na análise cromatográfica, problemas de solubilidade e formato de pico podem ocorrer, prejudicando a separação e a quantificação dos compostos. Quando o solvente de eluição é mais forte que a fase móvel, podem acontecer interferências na adsorção da amostra no topo da coluna, provocando “*peak fronting*”,

cauda, alargamento de banda e outras distorções (KEUNCHKARIAN *et al.*, 2006; PATIL *et al.*, 2008).

Deste modo, embora a eluição com acetonitrila tenha fornecido os maiores fatores de concentração para os compostos, a etapa de introdução da amostra no sistema HPLC em um solvente mais forte que a fase móvel (MeOH/H₂O, 62:38 v/v), resultou em problemas no equilíbrio desses diferentes solventes, resultando em “*peak fronting*” (SADEK; SADEK, 2002). O efeito de distorção dos picos pode ser observado na **figura 14**, após eluição com 100% de acetonitrila.

Figura 14. Comparação dos cromatogramas, obtido por HPLC, para os compostos diuron ($t_R = 5,4$ min), parationa metílica ($t_R = 6,7$ min) e clorotalonil ($t_R = 8,1$ min) após a eluição dos compostos com: (a) acetonitrila pura (100%) e (b) ACN:H₂O (70:30, v/ v).



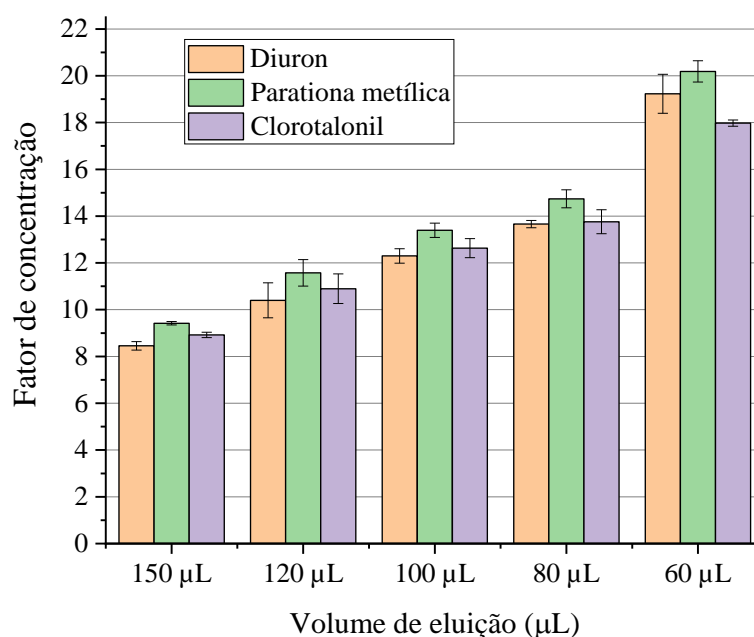
Assim, a mistura ACN:H₂O (70:30, v/v) foi escolhida como solvente de eluição dos compostos no procedimento MEPS.

4.2.2.2 Seleção do volume de solvente utilizado para eluição

Devido à pequena quantidade de fase extratora utilizada na técnica MEPS, a dessorção dos analitos pode ser realizada com um volume pequeno de solvente. A diminuição do volume de solvente empregado na eluição, possibilita que os analitos estejam presentes em maior concentração, o que resulta em aumento do sinal analítico (SILVEIRA *et al.*, 2020; FUMES; LANÇAS, 2017).

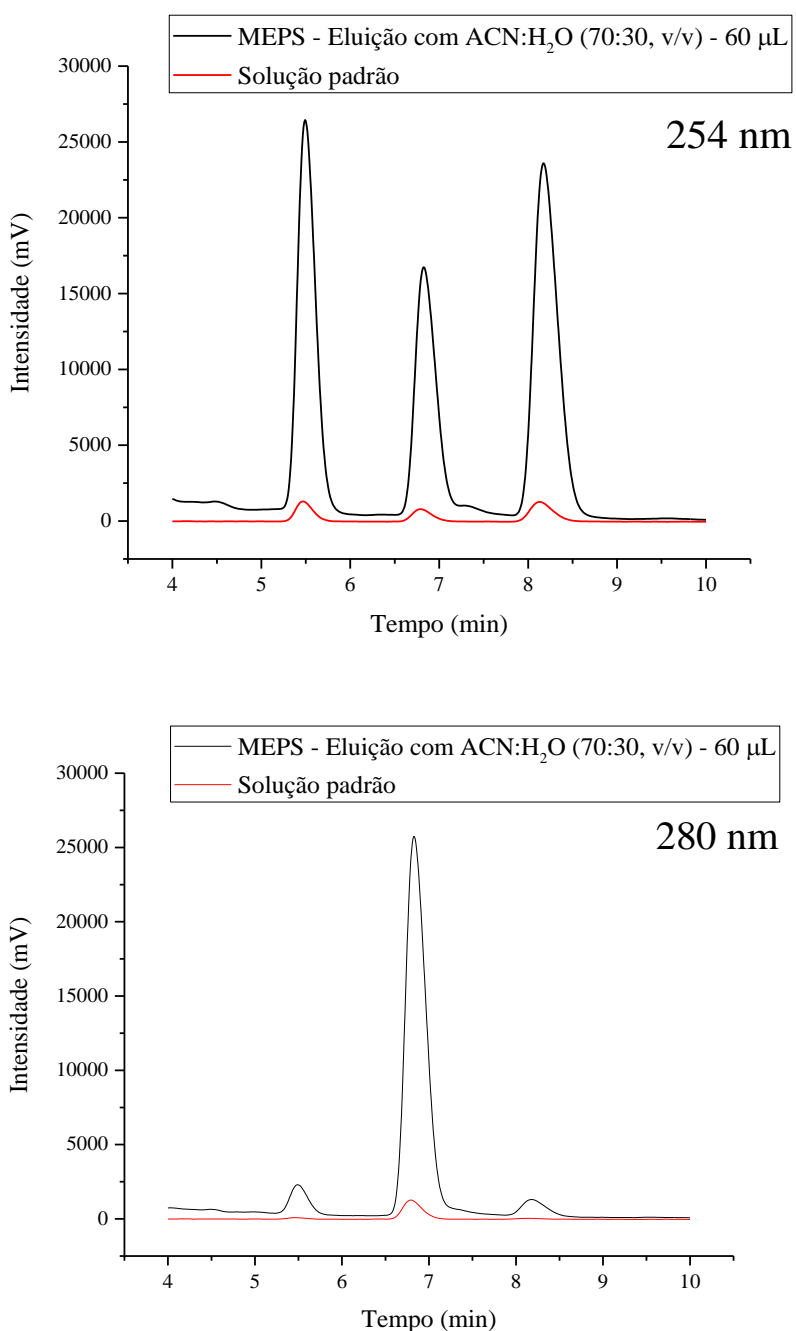
Assim, após a definição do solvente de eluição, foram avaliados diferentes volumes de eluição, com a finalidade de encontrar o menor volume capaz de fornecer um bom compromisso entre o fator de concentração e aplicabilidade prática. Foram realizados ensaios com os seguintes volumes da mistura ACN:H₂O (70:30, v/v) e 10 ciclos de eluição: 150 μ L, 120 μ L, 100 μ L, 80 μ L e 60 μ L. Os resultados são ilustrados na **figura 15**.

Figura 15. Fator de concentração médio (n=3) dos compostos usando MEPS com fase extratora C18 e eluição com ACN:H₂O (70:30, v/v), 10 ciclos de eluição e diferentes solventes volumes de eluição.



Na **figura 16** são mostrados os cromatogramas da solução padrão e da amostra extraída utilizando, 60 μL da mistura ACN:H₂O (70:30, v/v) como solvente de eluição. A área cromatográfica aumenta aproximadamente 19,2 vezes para o diuron, 20,2 vezes para a parationa metílica e 18,0 vezes para o clorotalonil, com DPR variando entre 0,7 e 4,3%.

Figura 16. Cromatogramas, obtido por HPLC, para os compostos diuron ($t_R = 5,4$ min), parationa metílica ($t_R = 6,7$ min) e clorotalonil ($t_R = 8,1$ min) na solução padrão e após MEPS com fase extratora C18, e eluição com 60 μL da mistura ACN:H₂O (70:30, v/v).



4.2.2.3 Avaliação da etapa adicional de limpeza da amostra carregada

A etapa de limpeza da amostra carregada é utilizada para a remoção de possíveis interferentes pouco retidos pela fase sólida, empregando um solvente que não possua força suficiente para arrancar os analitos de interesse. O solvente sugerido para ser utilizado nesta etapa é o próprio da amostra, desde que ele não remova também as substâncias de interesse (LANÇAS, 2004).

Assim, neste trabalho a etapa adicional de limpeza foi avaliada empregando água ultrapura como solvente de lavagem. O procedimento MEPS utilizado na avaliação dessa etapa é descrito a seguir:

1. Limpeza do sorvente: 200 μL de ACN (6 ciclos);
2. Condicionamento do sorvente: 200 μL de água (2 ciclos);
3. Carregamento da amostra (“extrair-descartar”):
 - a. 10 ciclos x 200 μL (2000 μL de amostra).
- 4. Etapa adicional de limpeza: 100 μL de H_2O (3 ciclos);**
4. Eluição: ACN:H₂O (70:30) - 60 μL (10 ciclos).

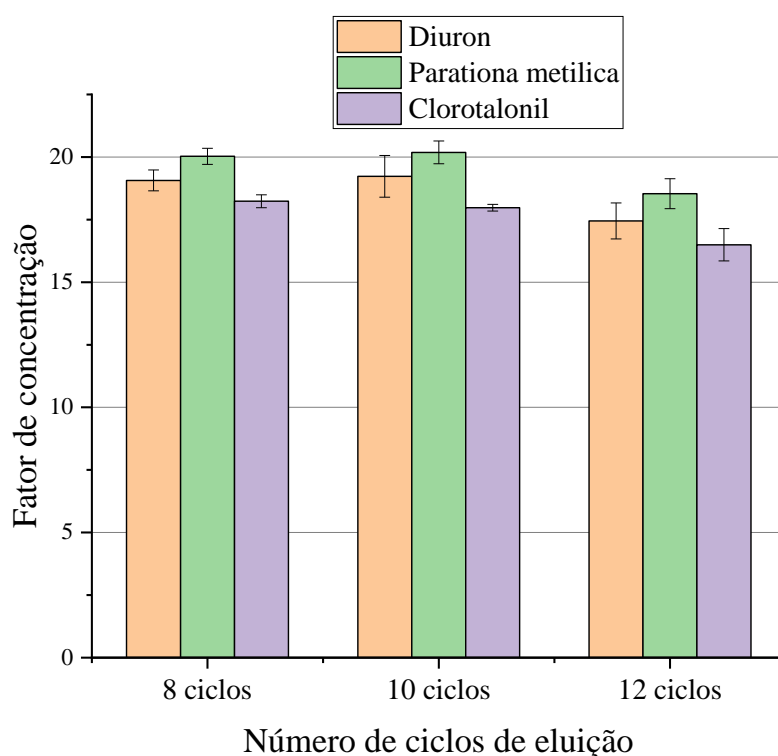
Os cromatogramas obtidos após os experimentos empregando a etapa de limpeza, mostraram que a intensidade do pico inicial (interferentes da matriz) diminuiu consideravelmente de intensidade (cerca de 30%), no entanto, os resultados quantitativos mostraram que houve uma diminuição também no fator de concentração dos compostos (média de 15%). Uma suposição para o resultado obtido, é que, como a amostra de suco de maçã é muito complexa, além da extração dos analitos acontecer por partição dos agrotóxicos no sorvente C18, os analitos também são adsorvidos por componentes da matriz retidos na fase extratora. Assim, quando realizada a etapa de limpeza com água, esses componentes da matriz são parcialmente removidos e junto com eles os agrotóxicos que estavam adsorvidos.

Portanto, decidiu-se não incluir a etapa de limpeza da amostra carregada no procedimento MEPS otimizado.

4.2.2.4 Seleção do número de ciclos de eluição

A última etapa da otimização consistiu em avaliar o número de ciclos de eluição (8, 10 e 12 ciclos), usando 60 μL da mistura ACN:H₂O (70:30, v/v) como solvente de eluição e os resultados estão representados na **figura 17**. A aspiração da solução de eluição para cima e para baixo pela seringa, em repetidos ciclos, pode levar a um aumento na quantidade de analitos removidos da fase extratora. Os resultados mostraram que o fator de concentração dos compostos não foi alterado quando no número de ciclos de eluição aumentou de 8 para 10, no entanto, uma pequena diminuição foi observada quando foram usados 12 ciclos de eluição. Assim, 8 ciclos de eluição foram definidos para o procedimento, tornando o método mais rápido.

Figura 17. Fator de concentração médio (n=3) dos compostos usando MEPS com fase extratora C18, eluição com 60 μL de ACN:H₂O (70:30, v/v) e diferentes números de ciclos de eluição.



Posto isto, o procedimento MEPS otimizado utilizando C18 como sorvente é descrito a seguir:

- (1) limpeza do sorvente: 200 μ L de acetonitrila (6 ciclos);
- (2) condicionamento do sorvente: 200 μ L de água (2 ciclos);
- (3) carregamento da amostra:
 - a. 200 μ L da amostra, realizando 10 ciclos no modo “extrair-descartar”;
- (4) eluição dos analitos: 8 ciclos com 60 μ L de ACN:H₂O (70:30).

O procedimento MEPS otimizado é realizado em aproximadamente 13 minutos, sendo necessária uma etapa mínima de pré-tratamento da amostra (remoção de materiais particulados). O método MEPS desenvolvido consome 2,0 mL de amostra, 1,250 mL de acetonitrila e 0,418 mL de água, que são volumes pequenos de amostra e solventes quando comparados a métodos que utilizam outras técnicas de preparo de amostras, como extração líquido-líquido (SERESHTI *et al.*, 2020) e QuEChERS (FURLANI *et al.*, 2011; RIZZETTI *et al.*, 2016; FARAJZADEH; ALAVIAN; DABBAGH, 2019), além do baixo consumo de fase extratora, 5 mg de C18, que podem ser reutilizadas por mais de 70 vezes.

O método MEPS/HPLC-UV é executado em aproximadamente 23 minutos e, nas condições otimizadas os fatores de concentração foram de $19,1 \pm 2,2$ para o diuron, $20,0 \pm 1,6$ para a parationa metílica e $18,2 \pm 1,4$ para o clorotalonil. Com as características apresentadas, conclui-se que o método desenvolvido forneceu ótimos resultados em um tempo curto de preparo de amostra e análise, gerando poucos resíduos químicos e com poucas etapas analíticas.

4.3 Validação do método MEPS/HPLC-UV

A validação do método foi realizada para a matriz representativa (suco de maçã) e dados complementares foram coletados para os demais sucos (abacaxi, morango, uva e caju).

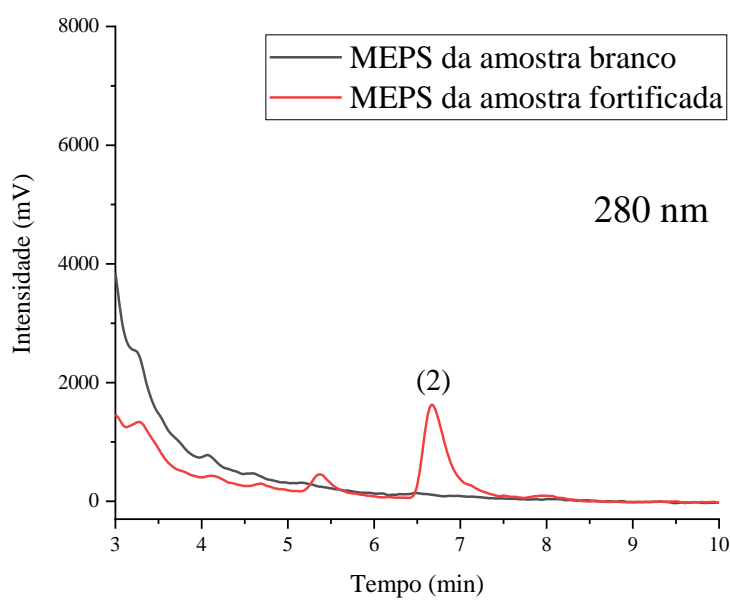
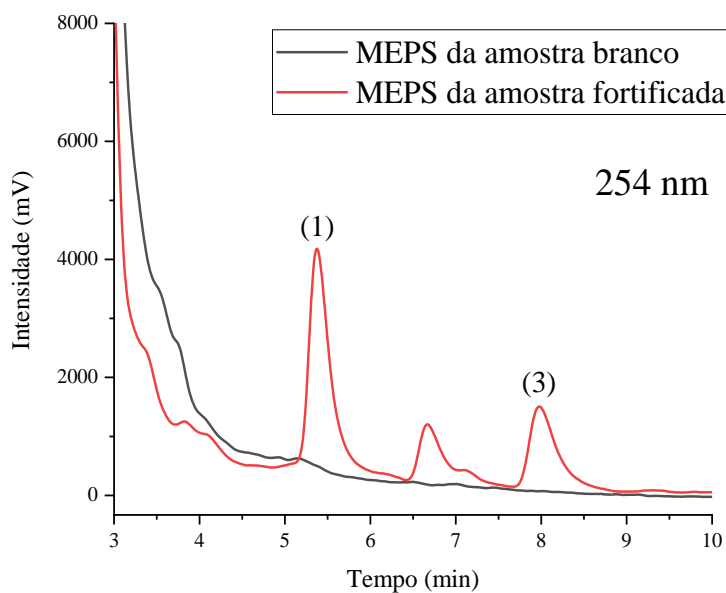
As figuras de mérito contempladas para a validação do método analítico desenvolvido (MEPS/HPLC-UV) para a determinação dos agrotóxicos diuron, parationa metílica e clorotalonil em suco foram: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão e robustez. Com o objetivo de demonstrar que o procedimento analítico é adequado para a determinação de resíduos de agrotóxicos, o estudo foi respaldado nas diretrizes da ANVISA, por meio da resolução RDC N° 166, de 24 de julho de 2017, pelo manual de garantia de qualidade analítica do MAPA e pelas orientações da Comissão Europeia por meio do Documento N° SANTE/12682/2019 (ANVISA, 2017; MAPA, 2011; EUROPEAN COMMISSION, 2020).

4.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada comparando os cromatogramas do suco de maçã sem fortificação (amostra branco) e do suco de maçã fortificado com os agrotóxicos (amostra fortificada) na concentração de 0,0500 mg L⁻¹, obtidos após a extração pelo método MEPS otimizado.

O método foi considerado seletivo, uma vez que não foi verificado nenhum interferente da matriz que elui no tempo de retenção dos agrotóxicos estudados, estando estes, bem separados dos compostos inerentes à matriz, sendo então capaz de determinar simultaneamente os analitos e na presença da matriz. Os cromatogramas são apresentados na **figura 18**.

Figura 18. Cromatogramas da amostra branco e da amostra fortificada (0,0500 mg L⁻¹), após o processo de extração por MEPS. (1) diuron ($t_R = 5,4$ min); (2) parationa metílica ($t_R = 6,7$ min); (3) clorotalonil ($t_R = 8,1$ min).



4.3.2 Limite de detecção, limite de quantificação e linearidade

Os valores para LD e LQ de cada agrotóxico, no método proposto, foram determinados por percepção visual, até se encontrar a menor concentração que pôde ser diferenciada do branco (LD) e a menor concentração que pôde ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (LQ), de acordo com os critérios do MAPA, da ANVISA e da Comissão Europeia, realizando seis réplicas nas concentrações alvo do LQ. Na **tabela 15** são mostrados os critérios de aceitação utilizados.

Tabela 15. Critérios de validação para limite de quantificação e linearidade.

	ANVISA/ MAPA	COMISSÃO EUROPEIA
LQ	5 réplicas DPR \leq 20% Recuperação: 70 - 120%	5 réplicas DPR \leq 20% Recuperação: 70 - 120% LQ deve ser \leq MRL*
Linearidade	5 concentrações diferentes $r \geq 0,990$	5 concentrações diferentes Desvio da concentração nominal: $\leq 20\%$

* Nível máximo de resíduos

Fonte: ANVISA, 2017; MAPA, 2011; EUROPEAN COMMISSION, 2020.

O LD foi 0,0010 mg L⁻¹ para diuron e parationa metílica, e 0,0015 mg L⁻¹ para clorotalonil. O LQ foi 0,0050 mg L⁻¹ para a parationa metílica e clorotalonil e 0,0100 mg L⁻¹ (diuron), com valores de recuperação na faixa de 112,1-115,7% e com desvios padrão relativos menores que 5,45% entre os resultados das seis réplicas realizadas para LQ (**tabela 16**).

Tabela 16. Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e resultados de linearidade para o método desenvolvido.

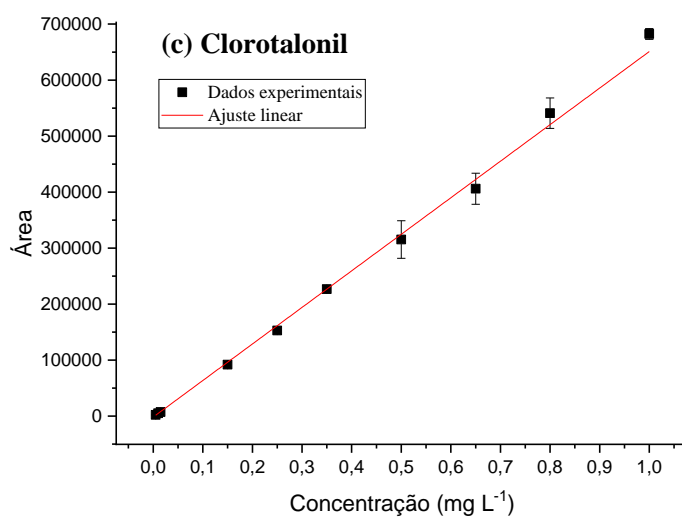
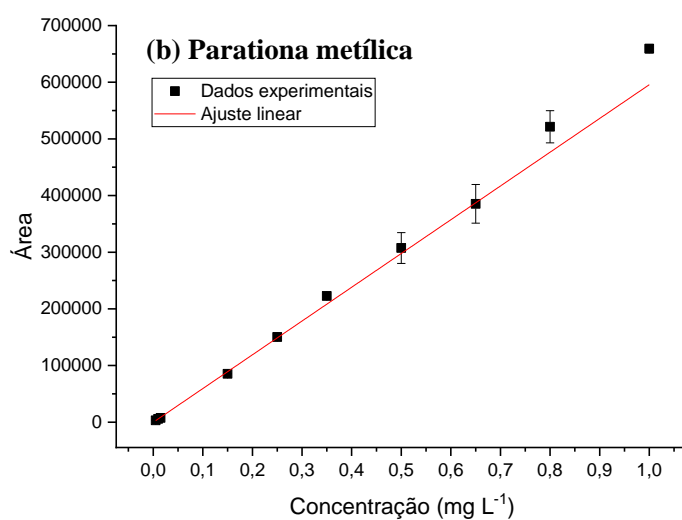
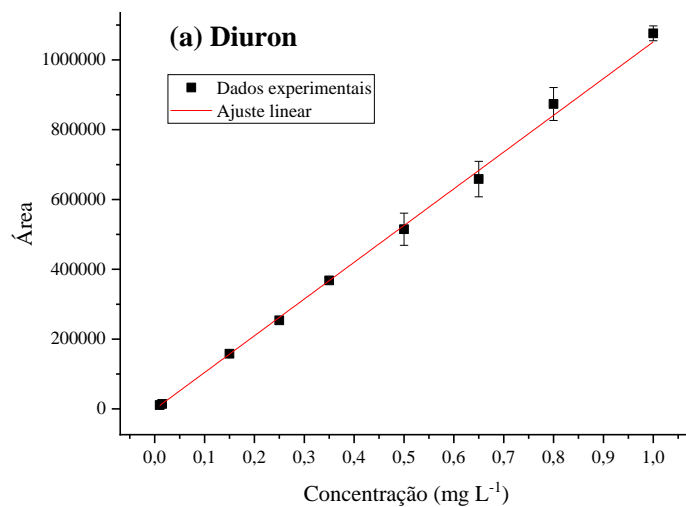
	Diuron	Parationa metílica	Clorotalonil
LD*	0,0010	0,0010	0,0015
LQ* (DPR, %)	0,0100 (5,3)	0,0050 (5,4)	0,0050 (3,6)
% Recuperação (LQ)	112,1	115,7	113,0
Faixa linear*	0,0100 - 1,0000	0,0050 - 1,0000	0,0050 - 1,0000
Coeficiente angular (b)	1,053x10 ⁶	5,960x10 ⁵	6,526x10 ⁵
Coeficiente linear (a)	-912,008	-267,184	-1643,699
Coeficiente de correlação (r)	0,9997	0,9969	0,9999

* Unidade de medida: mg L⁻¹

A linearidade foi avaliada pela obtenção de curvas de calibração construídas no extrato da matriz fortificada (suco de maçã), após extração por MEPS, com nove níveis de concentração para o diuron e dez níveis para a parationa metílica e clorotalonil, sendo que as três curvas foram construídas a partir do LQ de cada analito, até a concentração de 1,0000 mg L⁻¹. A faixa de concentração aferida mostrou-se linear (**tabela 16**), com valores de coeficiente de correlação maiores que 0,990, atendendo às recomendações da ANVISA. Os desvios entre as concentrações obtidas utilizando a função de calibração e as concentrações teóricas (nominais) foram inferiores a 20% para os LQs e inferiores a 15% para as demais concentrações da curva, atendendo às recomendações estabelecidas pelos órgãos regulamentadores (**tabela 15**).

As curvas de calibração obtidas para os três agrotóxicos são mostradas na **figura 19**.

Figura 19. Curvas de calibração obtidas para os agrotóxicos (a) diuron, (b) parationa metílica e (c) clorotalonil.



Os valores para o limite máximo de resíduos (LMR) dos agrotóxicos foram usados como referência para uma melhor avaliação do desempenho do método em relação aos valores de LD, LQ e linearidade. De acordo com as recomendações da instrução normativa nº 49, de 26 de setembro de 2018 do MAPA e, também, recomendações internacionais como as da *European Frut Juice Association*, para sucos de frutas podem ser adotados os mesmos valores de LMR estabelecidos para a fruta empregada como matéria-prima no seu preparo, sendo expressos em mg L^{-1} , pois os sucos são matrizes líquidas.

Na **tabela 17** são apresentados os valores para LMR, estabelecidos pela ANVISA, para os agrotóxicos avaliados neste estudo, nas respectivas matrizes. Quando o agrotóxico não tem autorização para ser usado em determinada cultura (matriz), a ANVISA adota a concentração de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ como LMR. Essa diretriz também é adotada em países membros da União Europeia e Estados Unidos. No banco de dados de pesticidas da União Europeia, o valor do LMR atual para os três agrotóxicos é de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ para qualquer cultura, sendo que, os mesmos não podem ser utilização nos países membros da Comissão Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2022b).

Tabela 17. Limites máximos de resíduo (mg L^{-1}) estabelecidos pela ANVISA.

	Diuron	Parationa Metílica	Clorotalonil
Abacaxi	0,10	NA (0,01)	NA (0,01)
Caju	NA (0,01)	NA (0,01)	NA (0,01)
Maçã	NA (0,01)	NA (0,01)	1,00
Morango	NA (0,01)	NA (0,01)	NA (0,01)
Uva	0,10	NA (0,01)	5,00

NA: Agrotóxico não autorizado na cultura.

Fonte: ANVISA, 2022d.

Os valores de LQ obtidos no método desenvolvido foram menores ($0,0050 \text{ mg L}^{-1}$) ou iguais ($0,0100 \text{ mg L}^{-1}$) aos valores de LMR observados na **tabela 17**, de modo que a faixa linear validada também contempla o LMR (PARA, 2019; ANVISA, 2022d).

4.3.3 Exatidão e precisão

A exatidão e a precisão do método foram estimadas através de ensaios intradia (ensaios realizados para três níveis de concentração em um único dia) e interdía (ensaios para os três níveis de concentração, repetidos em três dias diferentes).

A exatidão do método desenvolvido foi expressa através do cálculo da recuperação e a precisão foi expressa pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR) dos ensaios. Os critérios de aceitabilidade para a exatidão e precisão seguiram as orientações da Comissão Europeia e do MAPA (recuperação entre 70% e 120%, com precisão de $DPR \leq 20\%$) (MAPA, 2011; EUROPEAN COMMISSION, 2020)

Os resultados de exatidão e precisão do método são mostrados na **tabela**

Tabela 18. Sumário dos resultados de recuperação (R, %) e desvio padrão relativo (DPR, %) obtidos nos ensaios intradia e interdia para os agrotóxicos pelo método MEPS/HPLC-UV proposto.

Agrotóxico	Concentração (mg L ⁻¹)	Intradia						Interdia	
		Dia 1		Dia 2		Dia 3		(Dia 1, Dia 2, Dia 3)	
		R (%)	DPR (%)	R (%)	DPR (%)	R (%)	DPR (%)	R (%)	DPR (%)
Diuron	0,0500	109,4	2,8	108,7	2,4	109,0	5,1	109,0	3,4
	0,4000	102,3	5,6	102,0	3,5	100,7	2,5	101,7	3,9
	0,7000	92,4	6,4	104,4	6,5	103,6	4,4	100,1	7,9
Parationa metílica	0,0500	95,8	11,0	100,5	3,9	106,8	6,7	101,4	8,3
	0,4000	96,7	5,2	99,9	1,6	100,4	4,2	99,0	4,1
	0,7000	112,2	8,1	92,7	5,5	102,5	4,6	102,4	7,6
Clorotalonil	0,0500	90,3	4,0	87,8	5,4	92,3	3,6	90,1	4,7
	0,4000	110,2	5,1	93,7	0,7	102,5	3,1	102,1	7,6
	0,7000	106,2	8,1	87,5	5,6	92,6	4,3	95,4	10,4

Intradia - R: média aritmética (n = 6) entre os valores de recuperação; e DPR;

Interdia - R: média aritmética entre os valores de recuperação obtidos no dia 1, dia 2 e dia 3 (n=18); e DPR.

O método apresentou exatidão entre 87,5% e 112,2% para os três agrotóxicos nos ensaios intradia, com desvios padrões relativos inferiores a 11,0%, o que mostra que quantitativamente os resultados do método possuem uma baixa dispersão para múltiplas análises sob as mesmas condições e uma boa veracidade. A exatidão interdia foi calculada pelos resultados dos ensaios realizados em três dias diferentes, sendo os experimentos do dia 1 e o dia 2, realizados com um mesmo microdispositivo MEPS (que contém a fase extratora empacotada) e os ensaios do dia 3, realizados um microdispositivo MEPS diferente. A precisão intermediária do método, calculada para as dezoito réplicas, variou de 3,4% a 10,4%, demonstrando concordância entre os resultados das análises realizadas em dias diferentes, mesmo utilizando microdispositivos MEPS distintos.

A recuperação calculada para os ensaios interdia forneceu valores próximos à 100%, indicando concordância entre os resultados experimentais e os valores de referência. A faixa de recuperação foi de 100,1% a 109,0% para o diuron, de 99,0% a 102,4% para a parationa metílica, e para o clorotalonil de 90,1% a 102,1%.

Os resultados dos ensaios interdia também mostram a robustez do método MEPS, uma vez que os dados experimentais apontam que o procedimento não é afetado por pequenas variações em sua execução, tendo os resultados uma alta concordância, mesmo realizando múltiplos ensaios, com diferentes soluções, diferentes amostras de sucos, diferentes microdispositivos MEPS e dias distintos.

4.4 Análise de amostras comerciais

O método MEPS/HPLC-UV validado, foi aplicado na determinação de resíduos dos agrotóxicos estudados em suco comercial de maçã, morango, abacaxi, uva e caju. Todos os sucos foram adquiridos em estabelecimentos comerciais da cidade de Catalão (GO). Foram testados dois sucos integrais de maçã (suco “a” e suco “b”) de diferentes marcas que, de acordo com as descrições dos rótulos, continham apenas a fruta e água, sem adição de açúcares ou outros aditivos conservantes. Os sucos de morango, abacaxi, uva e caju foram preparados mediante polpas congeladas, de acordo com a descrição da embalagem.

Todos os sucos foram analisados pelo método proposto e os resultados mostraram que os resíduos dos agrotóxicos não estavam presentes em nenhuma das amostras em concentrações detectáveis pelo método.

As amostras comerciais dos sucos foram submetidas a ensaios adicionais a fim de confirmar a validade do método para estas matrizes. Deste modo, as amostras de suco de maçã, morango, abacaxi, uva e caju, foram fortificadas em dois níveis de concentração (0,0500 e 0,4000 mg L⁻¹) e submetidas ao método de extração, realizando triplicata para cada nível, a fim de verificar a exatidão e precisão do método para estas matrizes.

Os resultados de recuperação e desvio padrão relativo, para n=3, são apresentados na **tabela 19**.

Tabela 19. Resultados obtidos para a análise das amostras de sucos de frutas comerciais pelo método proposto (n=3).

		Concentrações de fortificação			
		0,0500 mg L ⁻¹		0,4000 mg L ⁻¹	
		R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)
Suco de maçã “a”	Diuron	77,4	11,8	104,6	6,3
	Parationa M.	100,3	10,5	96,1	14,7
	Clorotalonil	77,2	12,5	94,0	13,2
Suco de maçã “b”	Diuron	82,1	11,3	103,3	16,0
	Parationa M.	74,1	15,1	81,5	20,2
	Clorotalonil	90,4	14,0	84,6	19,5
Suco de abacaxi	Diuron	104,3	5,6	119,6	2,7
	Parationa M.	85,9	4,5	98,6	3,5
	Clorotalonil	80,5	4,4	105,7	5,6
Suco de morango	Diuron	104,2	1,7	112,6	4,1
	Parationa M.	92,0	4,2	93,6	2,6
	Clorotalonil	105,6	1,3	100,2	2,8
Suco de uva	Diuron	96,8	8,2	105,1	4,6
	Parationa M.	85,2	1,5	89,2	4,8
	Clorotalonil	101,1	7,1	90,7	6,3
Suco de caju	Diuron	102,1	1,5	108,0	7,1
	Parationa M.	67,0	1,9	72,6	7,8
	Clorotalonil	71,5	1,9	87,8	7,6

A recuperação e o desvio padrão relativo, nas duas concentrações avaliadas, para as amostras comerciais de todos os seis sucos avaliados são comparáveis aos resultados obtidos na validação do método, sendo um ótimo indicativo para a robustez do procedimento MEPS estudado. A recuperação variou entre 71,5% e 119,6%, sendo que, no suco de caju a recuperação para o agrotóxico parationa metílica foi de 67% na concentração de 0,0500 mg L⁻¹. Apesar do valor de recuperação não estar dentro da faixa sugerida, há uma tolerância para valores menores que os estabelecidos, desde que estes mostrem ser um resultado consistente, com um baixo DPR (EUROPEAN COMMISSION, 2020; MAPA, 2011). De modo geral, a repetibilidade dos resultados para as múltiplas amostras reais, foram menores que 20% para todos os analitos, sendo valores de precisão aceitáveis.

Os cromatogramas obtidos após o processo de extração MEPS para as amostras comerciais dos sucos de abacaxi, morango, uva e caju foram muito similares àqueles obtidos para o suco de maçã usado durante o desenvolvimento analítico. A seletividade do método para essas matrizes foi avaliada pela comparação dos cromatogramas das amostras de cada suco com o cromatograma do suco fortificado (**figuras 20 a 25**). Os cromatogramas mostram que não existem compostos das matrizes no mesmo tempo de retenção que os agrotóxicos avaliados, comprovando a seletividade.

Figura 20. Cromatograma da amostra comercial de **suco de maçã "a"**, branco e fortificado ($0,4000 \text{ mg L}^{-1}$), após o processo de extração por MEPS, com os agrotóxicos diuron ($t_R = 5,4 \text{ min}$), parationa metílica ($t_R = 6,7 \text{ min}$) e clorotalonil ($t_R = 8,1 \text{ min}$).

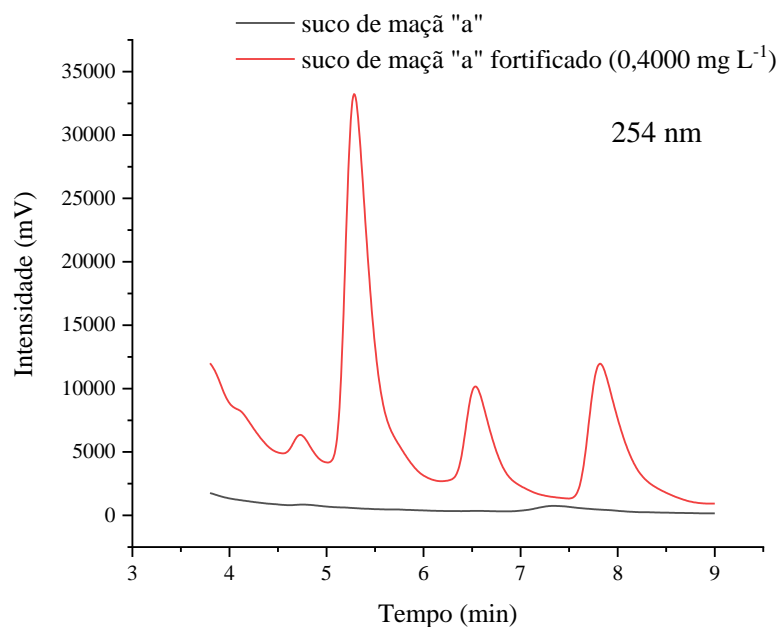


Figura 21. Cromatograma da amostra comercial de **suco de maçã "b"**, branco e fortificado ($0,4000 \text{ mg L}^{-1}$), após o processo de extração por MEPS, com os agrotóxicos diuron ($t_R = 5,4 \text{ min}$), parationa metílica ($t_R = 6,7 \text{ min}$) e clorotalonil ($t_R = 8,1 \text{ min}$).

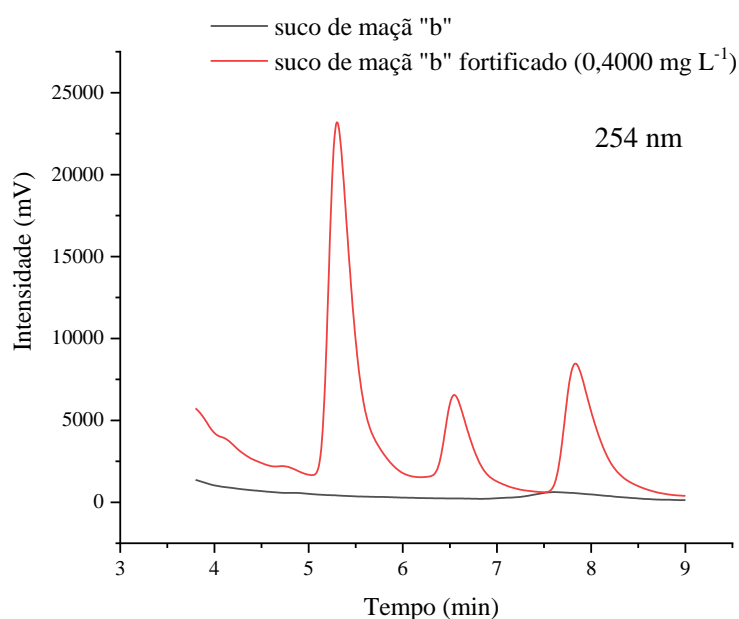


Figura 22. Cromatograma da amostra comercial de **suco de abacaxi**, branco e fortificado ($0,4000 \text{ mg L}^{-1}$), após o processo de extração por MEPS, com os agrotóxicos diuron ($t_R = 5,4 \text{ min}$), parationa metílica ($t_R = 6,7 \text{ min}$) e clorotalonil ($t_R = 8,1 \text{ min}$).

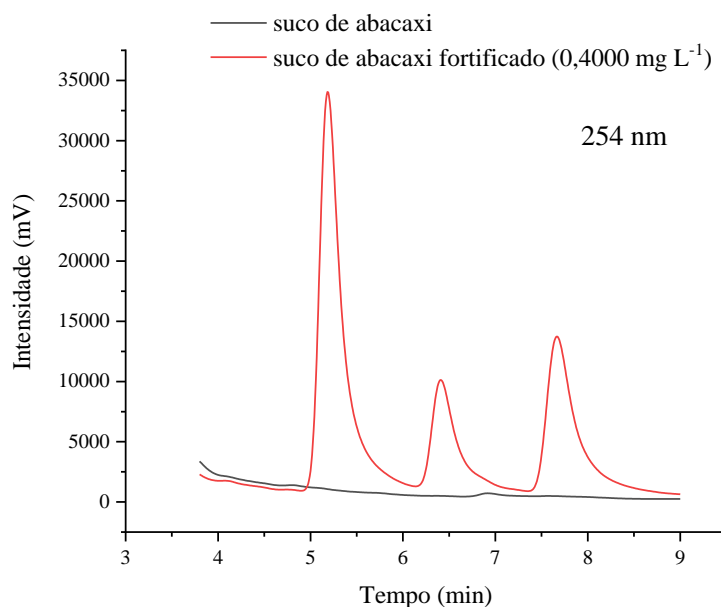


Figura 23. Cromatograma da amostra comercial de **suco de morango**, branco e fortificado ($0,4000 \text{ mg L}^{-1}$), após o processo de extração por MEPS, com os agrotóxicos diuron ($t_R = 5,4 \text{ min}$), parationa metílica ($t_R = 6,7 \text{ min}$) e clorotalonil ($t_R = 8,1 \text{ min}$).

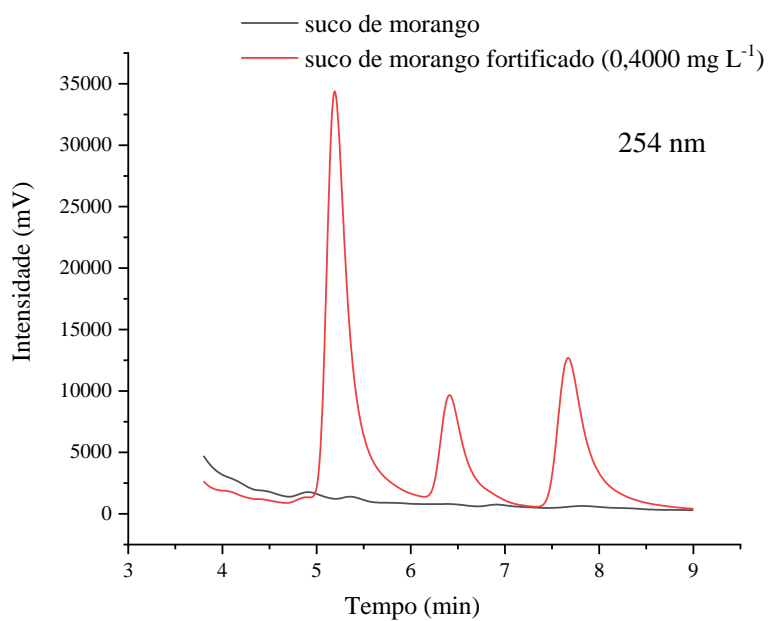


Figura 24. Cromatograma da amostra comercial de **suco de uva**, branco e fortificado ($0,4000 \text{ mg L}^{-1}$), após o processo de extração por MEPS, com os agrotóxicos diuron ($t_R = 5,4 \text{ min}$), parationa metílica ($t_R = 6,7 \text{ min}$) e clorotalonil ($t_R = 8,1 \text{ min}$).

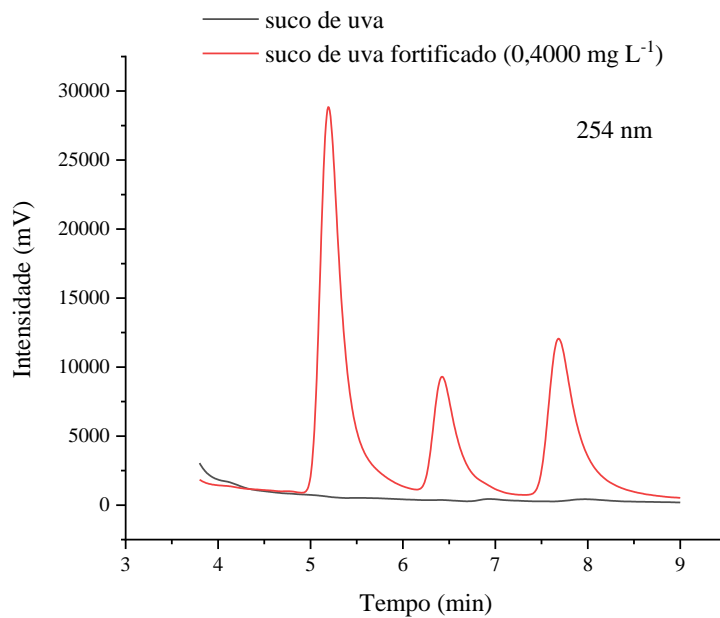
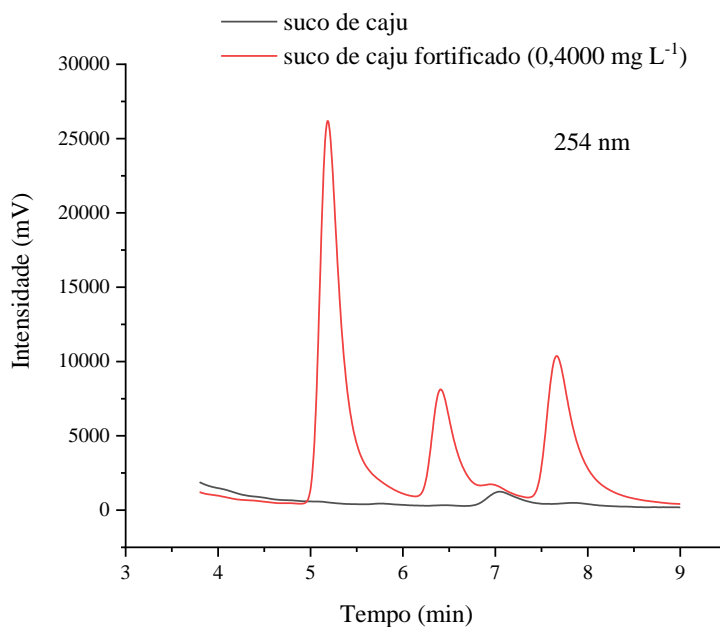


Figura 25. Cromatograma da amostra comercial de **suco de caju**, branco e fortificado ($0,4000 \text{ mg L}^{-1}$), após o processo de extração por MEPS, com os agrotóxicos diuron ($t_R = 5,4 \text{ min}$), parationa metílica ($t_R = 6,7 \text{ min}$) e clorotalonil ($t_R = 8,1 \text{ min}$).



4.5 Reutilização do microdispositivo, efeito de memória e eficiência após múltiplas análises

A capacidade de reutilização da C18 contida no microdispositivo (contém a fase extratora empacotada) é um fator importante. Em resumo, durante o desenvolvimento deste trabalho o mesmo microdispositivo foi reutilizado entre 61 e 70 vezes.

A reutilização é essencial para a economia de fase extratora e frequência analítica, porém quantidades de analitos podem permanecer no sorvente após a eluição (efeito de memória) ocasionando um arraste de analitos e/ou matriz entre as análises. Para minimizar o efeito de memória, ao final de um ciclo de extração é realizado a limpeza da fase sólida contida no microdispositivo. No método desenvolvido, para se reutilizar o microdispositivo é realizada uma limpeza com acetonitrila (6 ciclos de 200 μL) seguida por um condicionamento com água (2 ciclos de 200 μL). Para avaliar a eficiência da limpeza e a existência de efeito de memória, foram realizados ensaios com água ultra pura após o dispositivo ter sido utilizado na extração dos analitos nas amostras de sucos comerciais (fortificadas na concentração de 0,4000 mg L^{-1}).

Por intermédio da análise dos cromatogramas, é conclusivo que não ocorre efeito de memória dos analitos no procedimento desenvolvido e, mesmo quando o dispositivo é utilizado no preparo de amostras com grande quantidade de compostos interferentes, a transferência de compostos da matriz é muito baixa, ou seja, a etapa de limpeza e condicionamento são eficientes para a reutilização do microdispositivo.

A eficiência do sorvente (C18) empacotado no microdispositivo MEPS foi avaliada após o mesmo ser reutilizado durante as análises das múltiplas amostras comerciais, que resultaram em setenta reutilizações. O teste *t* de *Student* (95% de confiança) foi aplicado para avaliar se houve diferença significativa entre o primeiro procedimento MEPS realizado com a C18 contida no microdispositivo, e após os 70 procedimentos de extração. A aplicação do teste *t* mostrou que após a fase C18 ser reutilizada 70 vezes, não houve perda na eficiência de extração, uma vez que não houve diferença estatística entre os resultados da primeira e última extração realizadas com a mesma fase extratora (o valor de *t* crítico foi 3,18 e os valores calculados para *t* foram 2,20, 0,31 e 1,16 para diuron, parationa metílica e clorotalonil, respectivamente).

4.6 Comparação do método desenvolvido com outras abordagens

Apesar do grande potencial da técnica MEPS na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos, ela é pouco aplicada para esse tipo de análise (MARTINS *et al.*, 2021). Na **tabela 20**, estão relacionadas algumas características do método analítico desenvolvido neste trabalho e de outros desenvolvidos e publicados na literatura.

Em comparação aos estudos em que a etapa de extração e detecção dos analitos ocorreram pela técnica MEPS e HPLC-UV, este trabalho foi capaz de obter LD e LQ menores ou comparáveis, mesmo utilizando um volume pequeno de amostra; alcançando recuperações na faixa de 100% para os três agrotóxicos. É possível notar que quando a técnica MEPS é utilizada com o auxílio de um sistema de detecção mais sensível e seletivo, mesmo utilizando um volume de amostra muito pequeno, é possível alcançar LQ e LD menores que 1 ppb (FUMES *et al.*, 2016), mostrando sua grande capacidade analítica.

Trabalhos utilizando a técnica MEPS/HPLC-UV que tenham entre os analitos de interesse um ou os três agrotóxicos estudados neste trabalho, não foram encontrados. Mas em exemplo, o diuron e o clorotalonil já foram extraídos e concentrados pela técnica de preparo de amostra QuEChERS (MACHADO; DOL, 2021; RIZZETTI *et al.*, 2016) e a parationa metílica pela técnica SPME (MIRABELLI *et al.*, 2018). Este trabalho forneceu valores de LD, LQ e recuperação melhores ou similares a esses estudos, mesmo quando a técnica QuEChERS foi associada a detecção MS/MS, sendo que, apesar de ser uma técnica multiresidual, o QuEChERS consome grandes volumes de amostra, solventes e reagentes e é pouco seletivo (DINALI *et al.*, 2021).

Tabela 20. Comparação do método proposto com outros métodos.

Analitos	Matriz	Preparo de amostra	Método analítico	Amostra (μL)	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (%)	Referência
Diuron Parationa m. Clorotalonil	Suco de maçã	MEPS	HPLC-UV	2000	1,0 – 1,5	5,0 – 10,0	87,5 – 112,2	Este trabalho
3 agrotóxicos	Suco de maçã	MEPS	HPLC-UV	100	5,0	20,0	76,2 - 96,1	DINALI (2021)
4 agrotóxicos	Suco de frutas	MEPS	HPLC-UV	20000	0,23-1,21	0,75-3,52	-	SUN (2019)
Biomarcadores	Urina	MEPS	HPLC-UV	-	20,0 - 500	50,0 - 1000	70,1 - 87,0	KURD (2022)
6 agrotóxicos	Caldo de cana	MEPS	GC-MS	250	0,2-1,5	2,0-10,0	71,7 - 106,9	FUMES (2016)
5 agrotóxicos	Água	UA-DLLME	HPLC-UV	8000	0,3-0,6	1,0-2,0	80,9 - 109,9	LIU (2019)
8 agrotóxicos	Alimentos	PT- μ SPE	HPLC-UV	1250	0,3-1,5	1,0-5,0	78,3 - 89,3	AMINI (2022)
Clorotalonil	Morango	QuEChERS	HPLC-DAD	10,0 (g)	0,011 (mg/kg)	0,020 (mg/kg)	62,3 - 95,4	MACHADO (2021)
Diuron	Sucos e água	BIA	Detecção amperométrica	75	84,0	-	80,8 - 105,5	ALVES (2022)
Parationa m.	Suco de uva	SPME	MS	9000	10,0	30,0	-	MIRABELLI (2018)
Diuron	Suco de laranja	QuEChERS	UHPLC-MS/MS	10000	3,0	7,7	77 - 101	RIZZETTI (2016)
Agrotóxicos					3,0-7,6	4,9-26,0	70 - 118	

5 CONCLUSÃO

O procedimento MEPS otimizado é composto por poucas etapas analíticas, sendo rápido e eficiente na extração e pré-concentração dos analitos, atingindo fatores de concentração superiores a 18,2 para os três agrotóxicos.

O detector empregado (UV) no equipamento de cromatografia líquida utilizado apresenta sensibilidade e seletividade limitada em relação a outros sistemas de detecção como, por exemplo, detecção por espectrometria de massa (LC-MS). No entanto, a alta eficiência na pré-concentração do método proposto, aumentou significativamente a detectabilidade dos analitos no sistema cromatográfico utilizado (HPLC-UV), sendo possível obter resultados quantitativos tão satisfatórios quanto aqueles reportados para métodos que utilizam cromatografia líquida com sistemas de detecção mais sensíveis e seletivos, mas que nem sempre estão disponíveis nos laboratórios de análise por serem mais caros. Em relação ao consumo de solventes, amostra e fase sólida, o método utilizou menos de 1,3 mL de acetonitrila, aproximadamente 0,5 mL de água, 2,0 mL de amostra e apenas 5 mg de C18, sendo que essa massa pode ser utilizada por mais de 70 vezes sem diminuição na eficiência de extração.

O método MEPS/HPLC-UV validado apresentou resultados satisfatórios para linearidade, seletividade, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão, robustez. Os limites de detecção obtidos ($1,0-1,5 \mu\text{g L}^{-1}$) são compatíveis com os reportados na literatura. Os limites de quantificação ($5,0$ a $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$) são menores ou iguais (dependendo do agrotóxico e da matriz avaliada) aos valores dos limites máximos de resíduos permitidos (LMR) pela legislação vigente.

A aplicação do método proposto a amostras comerciais dos sucos de maçã, abacaxi, morango, uva e caju mostrou que nenhum dos agrotóxicos avaliados (diuron, parationa metílica e clorotalonil) foi observado acima do LMR permitido.

Diante do desempenho satisfatório deste estudo, é possível considerar que um método eficiente, com consumo muito baixo de solvente, sorvente e amostra, para a determinação dos agrotóxicos diuron, parationa metílica e clorotalonil em sucos de frutas foi desenvolvido utilizando a técnica de microextração por sorvente empacotado (MEPS) e análise por HPLC-UV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 701, n. 2, p. 119-128, 2011.

ABDEL-REHIM, M. New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications: I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 801, p. 317-321, 2004.

ABRAFRUTAS. **Arquivo de categorias: Dados e Estatísticas**, 2022a. Disponível em: <<https://abrafrutas.org/category/dados-e-estatisticas/>>. Acesso em: 23 junho 2022a.

ABRAFRUTAS. **Fonte de saúde e renda, frutas são destaque da FAO em 2021**, 2021. Disponível em: <<https://abrafrutas.org/2022/04/fonte-de-saude-e-renda-frutas-sao-destaque-da-fao-em-2021/>>. Acesso em: 23 junho 2022.

ALVES, G. F.; FARIA DE, L. V.; LISBOA, T. P.; MATOS, M. A. C.; MUÑOZ, R. A. A.; MATOS, R. C. Simple and fast batch injection analysis method for monitoring diuron herbicide residues in juice and tap water samples using reduced graphene oxide sensor. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 106, 104284, 2022.

ANDRADE, F. N.; SANTOS-NETO, Á. J.; LANÇAS, F. M. Microextraction by packed sorbent liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry of triazines employing a molecularly imprinted polymer. **Journal of separation science**, v. 37, n. 21, p. 3150-3156, 2014.

AGHDAM, M. B.; FARAJZADEH, M. A.; MOGADDAM, M. R. A. Partially carbonized cellulose filter paper as a green adsorbent for the extraction of pesticides from fruit juices. **Journal of Chromatography A**, v. 1648, 462220, 2021.

AGILENT. **Solid phase extraction (SPE)**, 2021. Disponível em: <<https://www.agilent.com/en/product/sample-preparation/solid-phase-extraction-spe>>. Acesso em: 31 agosto 2021.

AGROFIT – Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2022. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 06 maio 2022.

AIJN. **Position paper on pesticide residues in fruits, vegetables and juices**, 2010. Disponível em: <https://aijn.eu/files/attachments/.367/AIJN_position_paper_on_pesticides_residues_in_fruit_juices_may_2010.pdf>. Acesso em: 24 junho 2022.

AL-NASIR, F. M.; JIRIES, A. G.; AL-RABADI, G.; ALU'DATT, M. H.; TRANCHANT, C. C.; AL-DALAIN, S. A.; ALRABADI, N.; MADANAT, O. Y.; AL-DMOUR, R. S. Determination of pesticide residues in selected citrus fruits and vegetables cultivated in the Jordan Valley. **LWT**, v. 123, 109005, 2020.

ALTUN, Z.; ABDEL-REHIM, M. Study of the factors affecting the performance of microextraction by packed sorbent (MEPS) using liquid scintillation counter and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 630, n. 2, p. 116-123, 2008.

AMINI, S.; EBRAHIMZADEH, H. PVA/Stevia/MIL-88A@AuNPs composite nanofibers as a novel sorbent for simultaneous extraction of eight agricultural pesticides in food and vegetable samples followed by HPLC-UV analysis. **Food Chemistry**, v. 386, 132734, 2022.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monografias de agrotóxicos: Índice Monografico D25 – Diurom**, 2022a.

Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/d/4283json-file-1>>. Acesso em: 03 maio 2022.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monografias de agrotóxicos: Índice Monografico P03 – Parationa-metílica**, 2022b.

Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-excluidas/p03-2013-parationa-metilica.pdf>>. Acesso em: 03 maio 2022.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monografias de agrotóxicos: Índice Monografico C18 – Clorotalonil**, 2022c.

Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/c/4225json-file-1>>. Acesso em: 06 maio 2022.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monografias de agrotóxicos**.

Ministério da Saúde, 2022d. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoinformacao/dadosabertos/informacoes-analiticas/monografias-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 31 maio 2022.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. Ministério da Saúde, 2020.

Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>>. Acesso em: 18 setembro 2021.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Proibido uso de agrotóxicos com Parationa Metílica**. Ministério da Saúde, 2016. Disponível em:

<<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2016/proibido-uso-de-agrotoxicos-com-parationa-metilica>>. Acesso em: 18 setembro 2021.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). **Resolução RDC nº 166**, de 24 de julho de 2017.

- ARAGÃO, N. M. DE; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. DE. Validação de métodos cromatográficos de análise - um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.
- ARAÚJO, I. C. L.; MELO, V. F.; ABATE, G.; DOLATTO, R. G. Sorção de diuron em minerais da fração argila. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1312-1317, 2012.
- ARCOLEO, A.; BIANCHI, F.; CARERI, M. A sensitive microextraction by packed sorbent-gas chromatography-mass spectrometry method for the assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons contamination in Antarctic surface snow. **Chemosphere**, v. 282, 131082, 2021.
- ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145-2148, 1990.
- BACMAGA, M.; WYSZKOWSKA, J.; KUCHARSKI, J. The influence of chlorothalonil on the activity of soil microorganisms and enzymes. **Ecotoxicology**, n. 27, p. 1188-1202, 2018.
- BANSAL, S.; DESTETANO, A. Key elements of bioanalytical method validation for small molecules. **The AAPS Journal**, v. 9, n. 1, p. E109-E114, 2007.
- BARBIERI, M. V.; POSTIGO, C.; GUILLEM-ARGILES, N.; MONLLOR-ALCARAZ, L. S.; SIMIONATO, J. I.; STELLA, E.; BARCELÓ, D.; ALDA, M. L. Analysis of 52 pesticides in fresh fish muscle by QuEChERS extraction followed by LC-MS/MS determination. **Science of The Total Environment**, v. 653, p. 958-967, 2019.
- BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Solid-phase extraction (SPE) and solid-phase microextraction of pyrethroids in water. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 172-175, 2001.
- BEYER, A.; BIZIUK, M. Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food. **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 669-680, 2008.
- BIRK, L.; SANTOS, S. O.; ELLER, S.; MERIB, J. O.; OLIVEIRA, T. F. Determinations of new psychoactive substances in biological matrices with focus on microextraction techniques: a review of fundamentals and state-of-the-art extraction methods. **Forensic Toxicology**, n. 39, p. 350-367, 2021.
- BOMBARDI, L. M.; CHANGOE, A. Comércio tóxicos: a ofensiva do lobby dos agrotóxicos da União Europeia no Brasil. **Friends of the Earth Europe**, p. 26, 2022. Disponível em: < <https://friendsoftheearth.eu/publication/toxictrading/>>. Acesso 03 maio 2022.

BRASIL. **Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002.** Regulamenta a lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 08 de jan. 2002.

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

BURATO, J. S. S.; MEDINA, D. A. V.; TOFFOLI, A. L.; MACIEL, E. V. S.; LANÇAS, F. M. Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques. **Journal of Separation Science**, v. 43, n. 1, p. 202-225, 2020.

CARVALHO, M. M. X. D.; NODARI, E. S.; NODARI, R. O. Defensivos ou agrotóxicos? História do uso e da percepção dos agrotóxicos no estado de Santa Catarina, Brasil, 1950-2002. **História, Ciência, Saúde – Manguinhos**, v. 24, n. 1, p. 75-91, 2017.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CAVALHEIRO, J.; PRIETO, A.; MONPERRUS, M.; ETXEARRIA, N.; ZULOAGA, O. Determination of polycyclic and nitro musks in environmental water samples by means of microextraction by packed sorbents coupled to large volume injection-gas chromatography–mass spectrometry analysis. **Analytica chimica Acta**, v. 773, p. 68-75, 2013.

CHEN, L.; DANG, X.; AI, Y.; CHEN, H. Preparation of an acryloyl β -cyclodextrin-silica hybrid monolithic column and its application in pipette tip solid-phase extraction and HPLC analysis of methyl parathion and fenthion. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 18, p. 3503-3654, 2018.

CHIOU, C. T.; SCHMEDDING, D. W.; MANES, M. Improved prediction of octanol–water partition coefficients from liquid– solute water solubilities and molar volumes. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 22, p. 8840-8846, 2005.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006.

COMEX STAT. **COMEXVIS – Produtos**, 2022. Disponível em: <<http://comexstat.mdic.gov.br/pt/comex-vis>>. Acesso em: 23 junho 2022.

CONIDI, C.; CASTRO-MUÑOZ, R.; CASSANO, A. Membrane-based operations in the fruit juice processing industry: A review. **Beverages**, v. 6, n. 18, 2020.

CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Fast analysis of multiple pesticide residues in apple juice using dispersive liquid-liquid microextraction and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 51, p. 8835-8844, 2009.

DINALI, L. A. F.; DE OLIVEIRA, H. L.; TEIXEIRA, L. S.; DE SOUZA BORGES, W.; BORGES, K. B. (2021). Mesoporous molecularly imprinted polymer core@shell hybrid silica nanoparticles as adsorbent in microextraction by packed sorbent for multiresidue determination of pesticides in apple juice. **Food Chemistry**, v. 345, 128745, 2021.

EMBRAPA. **Suco de maçã: nova alternativa para agregar renda**, 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/40229489/suco-de-maca-nova-alternativa-para-agregar-renda>>. Acesso em: 23 junho 2022.

EUROPEAN COMMISSION. **Food Safety**: EU Pesticides Database, 2022b. Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en>. Acesso em: 31 maio 2022.

EUROPEAN COMMISSION. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. **Documento N° SANTE/12682/2019**, 2020.

EUROPEAN COMMISSION. **Search Active substances, safeners and synergists**: Diuron, 2022a. Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/active-substances/?event=as.details&as_id=692>. Acesso em: 31 maio 2022.

FARAJZADEH, M. A.; MOHEBBI, A.; FOULADVAND, H.; MOGADDAM, M. R. A. A new and facile method for preparation of amorphous carbon nanoparticles and their application as an efficient and cheap sorbent for the extraction of some pesticides from fruit juices. **Microchemical Journal**, v. 155, 104795, 2020.

FARAJZADEH, M. A.; ALAVIAN, A. S.; DABBAGH, M. S. Development of an efficient sample preparation method based on homogeneous liquid-liquid extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction solidification of floating organic drop for trace analysis of pesticide residues in fruit and fruit juice samples. **Food Analytical Methods**, v. 12, n. 12, p. 2730-2741, 2019.

FIELD, J. A.; REED, R. L.; SAWYER, T. E.; MARTINEZ, M. Diuron and its metabolites in surface water and ground water by solid phase extraction and in-vial elution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 10, p. 3897-3902, 1997.

FELÍCIO, A. L. S. M.; MONTEIRO, A. M.; ALMEIDA, M. B.; MADEIRA, T. B.; NIXDORF, S. L.; YABE, M. J. S. Validation of a liquid chromatography ultraviolet method for determination of herbicide diuron and its metabolites in soil samples. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 3, p. 1235-1241, 2016.

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz. **Nota técnica:** Reavaliação toxicológica do ingrediente ativo da parationa metílica. ANVISA e Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://antigo.anvisa.gov.br/documents/111215/117842/Nota%20t%C3%A9cnica%20da%20Parationa%20Met%20ADlica.pdf/8dd0de39-8d7a-4191-8b1c-872279bd6040?version=1.0>>. Acesso em: 01 outubro 2021.

FUMES, B. H.; ANDRE, F. N.; SANTOS NETO, A. J.; LANÇAS, F. M. Determination of pesticides in sugarcane juice employing microextraction by packed sorbent followed by gas chromatography and mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 14, p. 2823-2830, 2016.

FUMES, B. H.; LANÇAS, F. M. Use of graphene supported on aminopropyl silica for microextraction of parabens from water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1487, p. 64-71, 2017.

FURLANI, R. P. Z.; MARCILIO, K. M.; LEME, F. M.; TFOUNI, S. A. V. Analysis of pesticide residues in sugarcane juice using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with electron capture detection. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1283-1287, 2011.

GAMA, M. R.; SILVA, R. G. C.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. G. Hydrophilic interaction chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 48-60, 2012.

GAO, S.; LIU, Y.; JIANG, J.; JI, Q.; FU, Y.; ZHAO, L.; LI, C.; YE, F. Physicochemical properties and fungicidal activity of inclusion complexes of fungicide chlorothalonil with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 293, 111513, 2019.

GIACOMAZZI, S.; COCHET, N. Environmental impact of diuron transformation: a review. **Chemosphere**, v. 56, n. 1, p. 1021-1032, 2004.

GOLGE, O.; CINPOLAT, S.; KABAK, B. Quantification of pesticide residues in gherkins by liquid and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 96, 103755, 2021.

GRIMALT, S.; DEHOUCK, P. Review of analytical methods for the determination of pesticide residues in grapes. **Journal of Chromatography A**, v. 1433, p. 1-23, 2016.

HFBRASIL. **Hortifruti/CEPEA: Quais são as frutas e hortaliças mais consumidas pelo brasileiros?**, 2021. Disponível em: <<https://www.hfbrasil.org.br/br/hortifruti-cepea-quais-sao-as-frutas-e-hortalicas-mais-consumidas-pelos-brasileiros.aspx>>. Acesso em: 25 junho 2022.

HINTZE, S.; HANNALLA, Y. S. B.; GUINCHARD, S.; HUNKELER, D.; GLAUSER, G. Determination of chlorothalonil metabolites in soil and water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1655, 462507, 2021.

HOU, F.; ZHAO, L.; LIU, F. Determination of Chlorothalonil Residue in Cabbage by a Modified QuEChERS-Based Extraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 9, p. 656-663, 2016.

HUANG, X.; MA, J.; FENG, R.; WEI, S. Simultaneous determination of five organophosphorus pesticide residues in different food samples by solid-phase microextraction fibers coupled with high-performance liquid chromatography. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, p. 6998-7007, 2019.

HUOVINEN, M.; LOIKKANEN, J.; NAARALA, J.; VAHAKANGAS, K. Toxicity of diuron in human cancer cells. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 7, p. 1577-1586, 2015.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIA. **DOQ-CGCRE-008** - Orientações sobre validação de métodos analíticos. Coordenação Geral de Acreditação, revisão 09, 2020.

INVESTSP. **Mercado de sucos cresce no Brasil e ganha força nos supermercados**, 2021. Disponível em: <<https://www.investe.sp.gov.br/noticia/mercado-de-sucos-cresce-no-brasil-e-ganha-forca-nos-supermercados/>>. Acesso em: 23 junho 2022.

IPEA – Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. **Agrotóxicos no Brasil**: Padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória. Texto para Discussão, Brasília: Rio de Janeiro: Ipea, 2019.
Disponível em: <http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/9371/1/td_2506.pdf>. Acesso em: 2 outubro 2021.

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. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fase sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.

JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Solvent microextraction into a single drop. **Analytical chemistry**, v. 68, n. 13, p. 2236-2240, 1996.

JOHN, S.; KALE, M.; RATHORE, N.; BHATNAGAR, D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, n. 9, p. 500-504, 2001.

JORDAN-SINISTERRA, M.; LANÇAS, F. M. Microextração por sorvente empacotado de pesticidas selecionados em amostras de café empregando líquidos iônicos apoiados em nanofolhas de grafeno como fase de extração. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, p. 1-11, 2021.

KADIVAR, M.; ALIAKBAR, A. A new composite based on graphene oxide-poly 3-aminophenol for solid-phase microextraction of four triazole fungicides in water and fruit juices prior to high-performance liquid chromatography analysis. **Food chemistry**, v. 299, p. 125127, 2019.

KALENDER, S.; KALENDER, Y.; DURAK, D.; OGUTCU, A.; UZUNHISARCIKLI, M. CEVRIMLI, B. S.; YILDIRIM, M. Methyl parathion induced nephrotoxicity in male rats and protective role of vitamins C and E. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 2, p. 213-218, 2007.

KEUNCHKARIAN, S.; RETA, M.; ROMERO, L.; CASTELLS, C. Effect of sample solvent on the chromatographic peak shape of analytes eluted under reversed-phase liquid chromatographic conditions. **Journal of Chromatography A**, v. 1119, n. 1-2, p. 20-28, 2006.

KIEFER, K.; BADER, T.; MINAS, N.; SALHI, E.; JANSSEN, E. M.; GUNTEN, U. V.; HOLLENDER, J. Chlorothalonil transformation products in drinking water resources: Widespread and challenging to abate. **Water Research**, v. 183, 116066, 2020.

KIN, C. M.; HUAT, T. G. Comparison of HS-SDME with SPME and SPE for the determination of eight organochlorine and organophosphorus pesticide residues in food matrices. **Journal of chromatographic science**, v. 47, n. 8, p. 694-699, 2009.

KURD, N.; BAHRAMI, A.; AFKHAMI, A.; SHAHNA, F. G.; ASSARI, M. J.; FARHADIAN, M. Application of Fe₃O₄@ TbBd nanobeads in microextraction by packed sorbent (MEPS) for determination of BTEXs biomarkers by HPLC-UV in urine samples. **Journal of Chromatography B**, v. 1197, 123197, 2022.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos, SP: RiMa, 2004.

LEISTRA, M.; BERG, F. V. D. Volatilization of parathion and chlorothalonil from a potato crop simulated by the PEARL model. **Environmental Science e Technology**, v. 41, n. 7, p. 2243-2248, 2007.

LIU, H.; DASGUPTA, P. K. Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 11, p. 1817-1821, 1996.

LIU, X.; CHEN, M.; MENG, Z.; QIAN, H.; ZHANG, S.; LU, R.; GAO, H.; ZHOU W. Extraction of benzoylurea pesticides from tea and fruit juices using deep eutectic solvents. **Journal of Chromatography B**, v. 1140, 121995, 2020.

LIU, X.; LIU, C.; QIAN, H.; QU, Y.; ZHANG, S.; LU, R.; GAO, H.; ZHOU, W. Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on a hydrophobic deep eutectic solvent for the preconcentration of pyrethroid insecticides prior to determination by high-performance liquid chromatography. **Microchemical Journal**, v. 146, p. 614-621, 2019.

LOURENCETTI, C.; MARCHI, M. R. R.; RIBEIRO, M. L. Determinação de herbicidas de cana-de-açúcar em solo e solo tratado com vinhaça de cana-de-açúcar por extração em fase sólida e HPLC-UV. **Talanta**, v. 77, n. 2, p. 701-709, 2008.

LU, Y. C.; GUO, M. H.; MAO, J. H.; XIONG, X. H.; LIU, Y. J.; LI, Y. Preparation of core-shell magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticle for the rapid and selective enrichment of trace diuron from complicated matrices. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 177, p. 66-76, 2019.

LUCCHESI, G. **Agrotóxicos: construção da legislação**. Brasília: Consultoria Legislativa da Câmara dos Deputados, 2005. Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/estudos-e-notas-tecnicas/publicacoes-da-consultoria-legislativa/areas-da-conle/tema19/2005_13187.pdf>. Acesso em: 2 de outubro de 2021.

LUIZ, A. L.; MACIEL, E. V. S.; LANÇAS, F. M. Uma abordagem conceitual das técnicas miniaturizadas de preparo de amostra e suas aplicações na análise de resíduos e contaminantes em matrizes alimentares. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 3, p. 157-182, 2015.

MA, X.; WANG, J.; WU, Q.; WANG, C.; WANG, Z. Extraction of carbamate pesticides in fruit samples by graphene reinforced hollow fibre liquid microextraction followed by high performance liquid chromatographic detection. **Food chemistry**, v. 157, p. 119-124, 2014.

MACHADO, I.; DOL, I. Optimization of straightforward methods for the monitoring of organic and inorganic contaminants in strawberries. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 103, 104090, 2021.

MACIEL, E. V. S.; TOFFOLI, A. L.; NETO-SOBIESKI, E.; NAZARIO, C. E. D.; LANÇAS, R. M. New materials in sample preparation: Recent advances and future trends. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 119, 115633, 2019.

MAO, X.; WAN, Y.; LI, Z.; CHEN, L.; LEW, H.; YANG, H. Analysis of organophosphorus and pyrethroid pesticides in organic and conventional vegetables using QuEChERS combined with dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic droplet. **Food Chemistry**, v. 309, 125755, 2020.

MARTINS, R. O.; ARAÚJO, G. L.; FREITAS, C. S.; SILVA, A. R.; SIMAS, R. C.; VAZ, B. G.; CHAVES, A. R. Miniaturized sample preparation techniques and ambient mass spectrometry as approaches for food residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1640, 461949, 2021.

MASIÁ, A.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. Last trends in pesticide residue determination by liquid chromatography–mass spectrometry. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 2, p. 11-24, 2014.

MAPA. **Manual de garantia da qualidade analítica**. 1ª edição, Brasília: MAPA/ACS, 2011.

MAPA. **Instrução Normativa N° 49, de 26 de setembro de 2018**, DOU edição 187, seção 1, página 4, de 27 de setembro de 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; ANVISA. **Resolução da diretoria colegiada – RDC n° 56**, de 11 de dezembro de 2015, DOU n° 238, de 14 de dezembro de 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Intoxicação por agrotóxicos**. Biblioteca Virtual em Saúde. Disponível em: < <https://bvsmis.saude.gov.br/intoxicacao-por-agrotoxicos/>>. Acesso em: 17 agosto 2021.

MIRABELLI, M. F.; GIONFRIDDO, E.; PAWLISZYN, J.; ZENOBI, R. A quantitative approach for pesticide analyses in grape juice by direct interfacing of a matrix compatible SPME phase to dielectric barrier discharge ionization-mass spectrometry. **Royal Society of Chemistry**, v. 143, p. 891-899, 2018.

MOEDER, M.; SCHRADER, S.; WINKLER, U.; RODIL, R. At-line microextraction by packed sorbent-gas chromatography–mass spectrometry for the determination of UV filter and polycyclic musk compounds in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 17, p. 2925-2932, 2010.

MOEIN, M. M.; ABDEL-REHIM, A.; ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbent (MEPS). **Trends in Analytical Chemistry**, v. 67, p. 34-44, 2015.

MOHAMMED, A. M.; KARTTUNEN, V.; HUUSKONEN, P.; HUOVINEN, M.; AURIOLA, S.; VAHAKANGAS, K. Transplacental transfer and metabolism of diuron in human placenta. **Toxicology Letters**, v. 295, p. 307-313, 2018.

DASENAKI, M. E.; THOMAIDIS, N. S. Quality and authenticity control of fruit juices-a review. **Molecules**, v. 24, 1014, 2019.

NEVES, P. D. M.; MENDONÇA, M. R.; BELLINI, M.; PÔSSAS, I. B. Intoxicação por agrotóxicos agrícolas no estado de Goiás, Brasil, de 2005-2015: análise dos registros nos sistemas oficiais de informação. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 25, n. 7, p. 2743-2754, 2020.

NIST – Nacional Institute of Standards and Technology. **Diuron**. NIST Livro de Química na Web, SRD 69, 2022a. Disponível em: <<https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=330-54-1>>. Acesso em: 03 maio 2022.

NIST – Nacional Institute of Standards and Technology. **Methyl parathion**. NIST Livro de Química na Web, SRD 69, 2022b. Disponível em: <[https://webbook.nist.gov/cgi/inchi/InChI%3D1S/C8H10NO5PS/c1-12-15\(16%2C13-2\)14-8-5-3-7\(4-6-8\)9\(10\)11/h3-6H%2C1-2H3](https://webbook.nist.gov/cgi/inchi/InChI%3D1S/C8H10NO5PS/c1-12-15(16%2C13-2)14-8-5-3-7(4-6-8)9(10)11/h3-6H%2C1-2H3)>. Acesso em: 03 maio 2022.

NIST – Nacional Institute of Standards and Technology. **Tetrachloroisophthalonitrile**. NIST Livro de Química na Web, SRD 69, 2022c. Disponível em: <<https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C1897456&Mask=200>>. Acesso em: 06 maio 2022.

OLIVEIRA, T. C.; LANÇAS, F. M. Extração de pesticidas em amostras de alimentos através de sorção em ponteiras descartáveis. **Scientia Chromatographica**, v. 10, n. 4, p. 243-255, 2018.

OTTAVIO, F.; PELLE, F. D.; MONTESANO, C.; SCARPONE, R.; ESCARPONE, A.; COMPAGNONE, D.; SERGI, M. Determination of pesticides in wheat flour using microextraction on packed sorbent coupled to ultra-high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Food analytical methods**, v. 10, n. 6, p. 1699-1708, 2017.

PANO-FARIAS, N. S.; CEBALLOS-MAGAÑA, S. G.; JURADO, J. M.; AGUAYO-VILLARREAL, I. A.; MUÑIZ-VALENCIA, R. Analytical Method for Pesticides in Avocado and Papaya by Means of Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled to a Triple Quadrupole Mass Detector: Validation and Uncertainty Assessment. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 8, p. 2265-2272, 2018.

PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. **Relatório de Atividades de 2001-2007**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008.

PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. **Relatório das amostras analisadas no período de 2017-2018**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019.

PATIL, N. S.; MENDHE, R. B.; SANKAR, A. A.; IYER, H. Procedure for chromatography involving sample solvent with higher elution strength than the mobile phase. **Journal of Chromatography A**, v. 1177, n. 2, p. 234-242, 2008.

PAUMGARTTEN, F. JR. Pesticides and public health in Brasil. **Current Opinion in Toxicology**, v. 22, p. 7-11, 2020.

PENG, G.; HE, Q.; MMEREKI, D.; ZHOU, G.; PAN, W.; GU, L.; FAN, L.; TANG, X.; CHEN, J.; MAO, Y. Vortex-assisted liquid-liquid microextraction using a low-toxicity solvent for the determination of five organophosphorus pesticides in water samples by high-performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 20, p. 3487-3492, 2015.

PRIETO, A.; VALLEJO, A.; ZULOAGA, O.; PASCHKE, A.; SELLERGEN, A.; SCHILLINGER, E.; SCHRADER, S.; MODER, M. Selective determination of estrogenic compounds in water by microextraction by packed sorbents and a molecularly imprinted polymer coupled with large volume injection-*in-port*-derivatization gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 703, n. 1, p. 41-51, 2011.

QUINTO, M.; SPADACCINO, G.; NARDIELLO, D.; PALERMO, C.; AMODIO, P.; LI, D.; CENTONZE, D. Microextraction by packed sorbent coupled with gas chromatography-mass spectrometry: A comparison between “draw-eject” and “extract-discard” methods under equilibrium conditions for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1371, p. 30-38, 2014.

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

RIBANI, M.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. G. Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. **Journal of Chromatography A**, v. 1156, n. 1-2, p. 201-205, 2007.

RIZZETTI, T. M.; KEMMERICH, M.; MARTINS, M. L.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in orange juice by UHPLC–MS/MS. **Food Chemistry**, 196, 25-33, 2016.

ROBARDS, K.; HADDAD, P. R.; JACKSON, P. E. Principles and practice of modern chromatographic methods. **Elsevier Academic Press**, 2004.

ROCHA, M. S.; ARNOLD, L. L.; DODMANE, P. R.; PENNINGTON, K. L.; QIU, F.; CAMARGO, J. L. V.; COHEN, S. M. Diuron metabolites and urothelial cytotoxicity: In vivo, in vitro and molecular approaches. **Toxicology**, v. 314, n. 2-3, p. 238-246, 2013.

RÓDIO, G. R.; ROSSET, I. G.; BRANDALIZE, A. P. C. Exposição a agrotóxicos e suas consequências para a saúde humana. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, 2021.

RODRIGUES, D. P.; MITTERER-DALTOÉ, M. L.; LIMA, V. A. D.; BARRETO-RODRIGUES, M.; PEREIRA, E. A. Simultaneous determination of organic acids and sugars in fruit juices by High performance liquid chromatography: characterization and differentiation of commercial juices by principal component analysis. **Ciência Rural**, v. 51, n. 3, 2021.

SADEK, P. C.; SADEK, P. C. **The HPLC solvent guide**. New York: Wiley, 2002.

SANTOS NETO, ÁLVARO JOSÉ DOS. **Cromatografia líquida multidimensional e espectrometria de massas em tandem para análise direta de fármacos em fluidos biológicos: da escala convencional à miniaturizada**. 2007. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007. Acesso em: 13 setembro 2022.

SARTORE, D. M.; MEDINA, D. A. V.; COSTA, J. L.; LANÇAS, F. M.; SANTOS-NETO, A. J. Automated microextraction by packed sorbent of cannabinoids from human urine using a lab-made device packed with molecularly imprinted polymer. **Talanta**, v. 219, 121185, 2020.

SCIFINDER – A CAS Solution. **Substance Identifier**. Disponível em: <<https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>>. Acesso em: 01 outubro 2021.

SEEBUNRUENG, K.; SANTALADCHAIYAKIT, Y.; SRIJARANAI, S. Vortex-assisted low density solvent liquid–liquid microextraction and salt-induced demulsification coupled to high performance liquid chromatography for the determination of five organophosphorus pesticide residues in fruits. **Talanta**, v. 132, p. 769-774, 2015.

SERESHTI, H.; JAMSHIDI, F.; NOURI, N.; NODEH, H. R. Hyphenated dispersive solid- and liquid-phase microextraction technique based on a hydrophobic deep eutectic solvent: application for trace analysis of pesticides in fruit juices. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, p. 2534-2543, 2020.

SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos. **Química Nova**, v. 34, n. 4, 2011.

SILVEIRA, R. S.; ROCHA, B. A.; RODRIGUES, J. L.; BARBOSA, F. JR. Rapid, sensitive and simultaneous determination of 16 endocrine-disrupting chemicals (parabens, benzophenones, bisphenols, and triclocarban) in human urine based on microextraction by packed sorbent combined with liquid chromatography tandem mass spectrometry (MEPS-LC-MS/MS). **Chemosphere**, v. 240, Article 124951, 2020.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª edição, Rio de Janeiro: Thomson, 2006.

SOARES, V. R. B.; ROCHA, F. R. P.; REIS, B. F.; TEIXEIRA, L. S. G. A new device for flow-based liquid-liquid extractions. **Química Nova**, v. 38, n. 7, 2015.

SOUZA, I. D.; DOMINGUES, D. S.; QUEIROZ, M. E. C. Hybrid silica monolith for microextraction by packed sorbent to determine drugs from plasma samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 1, p. 166-175, 2015.

SUN, T.; FAN, Y.; FAN, P.; GENG, F.; CHEN, P.; ZHAO, F. Use of graphene coated with ZnO nanocomposites for microextraction in packed syringe of carbamate pesticides from juice samples. **Journal of Separation Science**, v. 42, n. 12, p. 2131-2139, 2019.

TEKIN, Z.; ER, E. O.; GUNKARA, O. T.; BAKIRDERE, S. A novel determination method for diuron in seaweed samples: Combination of quadruple isotope dilution strategy with liquid chromatography - quadrupole time of flight - tandem mass spectrometry for superior accuracy and precision. **Journal of Chromatography A**, v. 1611, 460612, 2020.

TOFFOLI, A. L. D.; LANÇAS, F. M. Recentes avanços da microextração em fase sólida no tubo (in-tube SPME) e sua aplicação em análises ambientais e alimentícias. **Scientia Chromatographia**, v. 7, p. 297-315, 2015.

TRULLOLS, E.; RUISÁNCHEZ, I.; RIUS, F. X. Validation of qualitative analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 137-145, 2004.

URIÓSTEGUI-ACOSTA, M.; TELLO-MORA, P.; SOLÍS-HEREDIA, M. J.; ORTEGA-OLVERA, J. M.; PIÑA-GUZMÁN, B.; MANTÍN-TAPIA, D.; GONZÁLEZ-MARISCAL, L.; QUINTANILLA-VEJA, B. Methyl parathion causes genetic damage in sperm and disrupts the permeability of the blood-testis barrier by an oxidant mechanism in mice. **Toxicology**, v. 438, 152463, 2020.

VIEIRA, A. A.; CALDAS, S. S.; KUPSKI, L.; TAVELLA, R. A.; PRIMEL, E. G. Extraction of chlorothalonil, dichlofluanid, DCOIT, and TCMTB from fish tissues employing the vortex assisted matrix solid-phase dispersion. **Microchemical Journal**, v. 143, p. 92-98, 2018.

VIÑAS, P.; AGUINAGA, N.; CAMPILLO, N.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Comparison of stir bar sorptive extraction and membrane-assisted solvent extraction for the ultra-performance liquid chromatographic determination of oxazole fungicide residues in wines and juices. **Journal of Chromatography A**, v. 1194, n. 2, p. 178-183, 2008.

WANG, S. Y.; SHI, X. C.; ZHU, G. Y.; ZHANG, Y. J.; JIN, D. Y.; ZHOU, Y. D.; LABORDA, P. Application of surface-enhanced Raman spectroscopy using silver and gold nanoparticles for the detection of pesticides in fruit and fruit juice. **Trends in Food Science & Technology**, v. 116, p. 583-602, 2021.

XUE, X.; WEI, Q.; WU, D.; LI, H.; ZHANG, Y.; FENG, R.; DU, B. Determination of methyl parathion by a molecularly imprinted sensor based on nitrogen doped graphene sheets. **Electrochimica Acta**, v. 116, p. 366-371, 2014.

WONG, A.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Determination of carbofuran and diuron in FIA system using electrochemical sensor modified with organometallic complexes and graphene oxide. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 731, p. 163-171, 2014.

WU, H.; LUO, Y.; HOU, C.; HUO, D.; WANG, W.; ZHAO, J.; LEI, Y. Rapid and fingerprinted monitoring of pesticide methyl parathion on the surface of fruits/leaves as well as in surface water enabled by gold nanorods based casting-and-sensing SERS platform. **Talanta**, v. 200, p. 84-90, 2019.

YANG, L.; SAID, R.; ABDEL-REHIM, M. Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): A review. **Journal of Chromatography B**, v. 1043, p. 33-43, 2017.

YANG, Q.; CHEN B.; HE, M.; HU, B. Sensitive determination of seven triazine herbicide in honey, tomato and environmental water samples by hollow fiber based liquid-liquid-liquid microextraction combined with sweeping micellar electrokinetic capillary chromatography. **Talanta**, v. 186, p. 88-96, 2018.

YILDIZ, E.; ÇABUK, H. A new solidified effervescent tablet-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of fungicides in fruit juice samples. **Analytical methods**, v. 10, n. 3, p. 330-337, 2018.

ZHANG, X.; ZHAO, L.; HUANG, M.; LI, X.; PAN, SI. In situ real-time tracing of organophosphorus pesticides in apples by solid-phase microextraction with developed sampling-rate calibration. **Molecules**, v. 24, n. 24, p. 4444, 2019.

ZHAO, E.; HAN, L.; JIANG, S.; WANG, Q.; ZHOU, Z. Application of a single-drop microextraction for the analysis of organophosphorus pesticides in juice. **Journal of Chromatography A**, v. 1114, n. 2, p. 269-273, 2006.

ZHOU, Y.; HAN, X.; BAO, Y.; ZHU, Z.; HUANG, J.; YANG, C.; HE, C.; ZUO, Z. Chronic exposure to environmentally realistic levels of diuron impacts the behaviour of adult marine medaka (*Oryzias melastigma*). **Aquatic Toxicology**, v. 238, 105917, 2021.