



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CATALÃO (UFCAT)
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA -
DOUTORADO EM ASSOCIAÇÃO ENTRE
UFCAT//UFGD//UEG**

PRISCILA AFONSO RODRIGUES DE SOUSA

**Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação
de resíduos de agrotóxicos em alimentos**

Bolsista FAPEG

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

Priscila Afonso Rodrigues de Sousa

3. Título do trabalho

Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos

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(a) autor(a) e ao(a) 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 **Luciana Melo Coelho, Professora do Magistério Superior**, em 29/08/2022, às 09:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **PRISCILA AFONSO RODRIGUES DE SOUSA, Discente**, em 21/09/2022, às 14:41, 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 **3147319** e o código CRC **789149CE**.

Referência: Processo nº 23070.045869/2022-79

SEI nº 3147319

PRISCILA AFONSO RODRIGUES DE SOUSA

Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química - Doutorado em Associação entre UFCAT//UFGD//UEG. da Unidade Acadêmica Instituto de Química da Universidade Federal de Catalão (UFCAT) como requisito para obtenção do título de Doutora em Química. Área de concentração: Química Analítica. Linha de pesquisa: Química Ambiental.

Orientadora: Prof. Dra. Luciana Melo Coelho (UFCAT)

Coorientador: Prof. Dr. Edmar Isaías de Melo (UFU)

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

Sousa, Priscila Afonso Rodrigues de
Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de
resíduos de agrotóxicos em alimentos / Priscila Afonso Rodrigues de
Sousa. - 2022.
147, CXLVII f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Melo Coelho; co-orientador Prof.
Dr. Edmar Isaías de Melo.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Catalão, Instituto de
Química, Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química, Catalão,
2022.

Bibliografia.

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

1. Detecção eletroquímica. 2. Agrotóxicos. 3. CPE. I. Coelho,
Luciana Melo, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE QUÍMICA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº **08** da sessão de Defesa de Tese de Priscila Afonso Rodrigues de Sousa que confere o título de Doutor(a) em Química, estudante de doutorado no Programa de Pós-graduação em Química em Associação entre UFCAT//UEG//UFGD.

Aos vinte e seis dias do mês de agosto de dois mil e vinte e dois, a partir da(s) **14:00 horas**, por videoconferência do google meet (<https://meet.google.com/ewi-ufdj-tpm>), realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “**Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de agrotóxicos em alimento.**” na área de concentração em Química. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), Professor(a) Doutor(a) Luciana Melo Coelho (IQ-UFCAT) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor(a) Doutor(a) Bruno Elias Dos Santos Costa IQ-UFCAT, membro titular externo; Professor(a) Doutor(a) Kátia Roberta Anacleto Belaz (IQ-UFCAT), membro titular externo; Professor(a) Doutor(a) Anizio Marcio de Faria (ICENP-UFU), membro titular externo; Professor(a) Doutor(a) Magno Aparecido Gonçalves Trindade (IQ-UFGD), membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestão de alteração do título do **trabalho “Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos.”** A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido(a) o(a) candidato(a) **aprovado(a)** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo(a) Professor(a) Doutor(a) Luciana Melo Coelho, 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

Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Melo Coelho, Professora do Magistério Superior**, em 29/08/2022, às 16:52, 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 **Magno Aparecido Gonçalves Trindade, Usuário Externo**, em 30/08/2022, às 08:50, 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 **ANIZIO MARCIO DE FARIA, Usuário Externo**, em 30/08/2022, às 08:56, 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 **Bruno Elias dos Santos Costa, Usuário Externo**, em 30/08/2022, às 11:51, 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 **Katia Roberta Anacleto Belaz, Usuário Externo**, em 30/08/2022, às 15:18, 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 **Edmar Isaías de Melo, Usuário Externo**, em 09/09/2022, às 09:32, 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 **3149656** e o código CRC **75C21429**.

Referência: Processo nº 23070.045869/2022-79

SEI nº 3149656

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS pela força em todos os momentos e pelas oportunidades que me foram dadas...

A minha mãe e irmãos que em vários momentos compreenderam minha ausência, mas nunca deixaram de me apoiar.

A minha avó Coraci, que apesar de não estar mais entre nós, foi a minha inspiração, força e perseverança.

Aos meus orientadores, Profa. Dra. Luciana Melo Coelho e Prof. Dr. Edmar Isaías de Melo pela orientação, confiança, amizade, oportunidade, apoio, paciência, ensinamentos, conselhos, alguns puxões de orelha e apoio em todos os momentos. Muito obrigada!

Agradeço a todos os professores que participaram de minha formação.

Agradecer a Universidade Federal de Uberlândia – Campus Monte Carmelo em nome dos professores Edmar Isaías de Melo e Rodrigo Amorim Bezerra da Silva por ceder o espaço físico, materiais e equipamentos para realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas que ajudaram no desenvolvimento do trabalho, João Luiz, André Luiz, José Guilherme, Luiz Fernando, Fabiano, Monique os quais possibilitaram trocas de conhecimento e pelo apoio moral, obrigada por toda ajuda...

Aos membros da banca de qualificação e defesa, pelas contribuições dadas.

A FAPEG pela ajuda financeira, concedendo a bolsa.

Ao Departamento de Química e ao Programa de Pós-graduação em Química - Doutorado em Associação entre UFCAT//UFGD//UEG.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, minha gratidão!!!

"Agradeço a todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito."

Chico Xavier

RESUMO

O presente trabalho foi dividido em dois momentos. No primeiro capítulo utilizou-se o método de extração por ponto nuvem (CPE) para a extração e pré-concentração dos agrotóxicos 2,4 D, atrazina, malation, metil paration, fipronil, diazinon, deltametrina e clorpirifós em amostras de milho e mel utilizando os surfactantes Triton X 100 e 114 e posterior detecção por HPLC/UV. As variáveis pH, concentração de surfactante, concentração de NaCl e tempo de aquecimento foram analisadas de forma univariada. Limites de detecção (LD, $S/R = 3$) e quantificação (LQ) variaram de 0,5 a 0,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 5,0 a 8,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, utilizando o processo CPE. A validação do método foi feita a partir de ensaios intra-dia e inter-dia, obtendo-se valores de recuperação que variaram de 47,0 a 112,3%. O método proposto foi aplicado em amostras de milho e mel e os resultados obtidos mostraram-se promissores. No segundo capítulo estudou-se a extração do agrotóxico metil paration em amostras de mel utilizando CPE e detecção eletroquímica por voltametria de onda quadrada. As variáveis concentração de surfactante, concentração de NaCl e tempo de aquecimento foram estudadas por meio de Planejamento Fatorial 2^4 e por Planejamento Composto Central (PCC). As recuperações obtidas variaram de 94 a 104% e os limites de detecção e quantificação foram de 0,006 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,021 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Palavras chave: Detecção eletroquímica, agrotóxicos, CPE.

ABSTRACT

This work was divided into two moments. In the first chapter, the cloud point extraction (CPE) method was used for the extraction and pre-concentration of pesticides 2,4 D, atrazine, malathion, methyl parathion, fipronil, diazinon, deltamethrin and chlorpyrifos in samples of corn and honey. using Triton X 100 and 114 surfactants. The variables pH, surfactant concentration, NaCl concentration and heating time were analyzed in a univariate manner. Limits of detection (LD, S/R = 3) and quantification (LQ) ranged from 0.0005 to 0.0008 mg kg⁻¹ and 0.005 to 0.008 mg kg⁻¹, respectively, using the CPE process. The validation of the method was carried out from intra-day and inter-day tests, obtaining recovery values ranging from 47.0 to 112.3%. The proposed method was applied to corn and honey samples and the results obtained were promising. In the second chapter, the extraction of the pesticide methyl parathion in honey samples was studied using CPE and electrochemical detection by square wave voltammetry. The variables surfactant concentration, NaCl concentration and heating time were studied using 2⁴ Factor Design and central compound analysis (CCD). The recoveries obtained ranged from 94 to 104% and the limits of detection and quantification were 0.006 μmol L⁻¹ and 0.021 μmol L⁻¹, respectively.

Keywords: Electrochemical detection, pesticides, CPE.

LISTA DE FIGURAS

➤ INTRODUÇÃO

Figura 1: Estrutura química da atrazina.....	5
Figura 2: Estrutura química do malation.....	5
Figura 3: Estrutura química do fipronil.....	6
Figura 4: Estrutura química do diazinon.....	6
Figura 5: Estrutura química do clorpirifós.....	7
Figura 6: Estrutura química da deltametrina.....	7
Figura 7: Estrutura química da parationa metílica.....	8
Figura 8: Estrutura química do 2,4 D.....	8
Figura 9: Estrutura química do diuron.....	9
Figura 10: Estrutura química do ciproconazol.....	9

➤ CAPÍTULO 1: EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

Figura 1. Etapas de extração dos agrotóxicos por ponto nuvem.....	28
Figura 2. Etapas utilizadas nas análises pelo método QuEChERS original e acetato.....	30
Figura 3. Cromatograma dos padrões dos agrotóxicos em solvente acetonitrila nas condições otimizadas em HPLC/UV: 1- 2,4D; 2- atrazina; 3- metil paration; 4- malation; 5- fipronil; 6- diazinon; 7- deltametrina; 8- clorpirifós.....	35
Figura 4. Estudo do tempo de contato para obtenção da matriz de cada alimento: matriz milho com TX-100 (A) e TX-114 (B); matriz mel com TX-100 (C) e TX-114 (D). CLP: clorpirifós; DELT: deltametrina; MP: metil paration; MALT: malation; DIZ: diazinon; ATZ: atrazina; FIPR: fipronil.....	37
Figura 5. Estudo da influência da variação do pH na etapa de extração: matriz milho com TX-100 (A) e TX-114 (B); matriz mel com TX-100 (C) e TX-114 (D). CLP: clorpirifós; DELT: deltametrina; MP: metil paration; MALT: malation; DIZ: diazinon; ATZ: atrazina; FIPR: fipronil.....	39
Figura 6: Estudo da influência da concentração do eletrólito (NaCl) na etapa de extração dos agrotóxicos: matriz milho com TX-100 (A) e TX-114 (B); matriz mel com TX-100 (C) e TX-114 (D). CLP: clorpirifós; DELT: deltametrina; MP: metil paration; MALT: malation; DIZ: diazinon; ATZ: atrazina; FIPR: fipronil.....	47

Figura 7: Cromatogramas obtidos por HPLC-UV dos extratos das amostras para estudos de seletividade: Matriz milho sem extração por CPE (A); Matriz mel sem extração por CPE (B); Matriz milho com extração por CPE (C); Matriz mel com extração por CPE (D).....53

Figura 8: Efeito de matriz observado na relação entre soluções preparadas em solvente e no extrato das matrizes empregando o método CPE com TX-100 (A) e TX-114 (B). CLP: clorpirifós; DELT: deltametrina; MP: metil paration; MALT: malation; DIZ: diazinon; ATZ: atrazina; FIPR: firponil.....56

➤ **CAPÍTULO 2: DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE METIL PARATION EM MEL UTILIZANDO ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO APÓS EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM**

Figura 1: Esquema de preparação das amostras de mel fortificadas e não fortificadas com metil paration.....76

Figura 2: Esquema de Extração por Ponto Nuvem e determinação eletroquímica.....78

Figura 3: (A) Voltamogramas cíclicos do metil paration ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) em soluções tampão BR (faixa de pH 2,0 a 10,0). (B) Gráfico da dependência de E (V) vs. pH e inclinação da equação de regressão linear. (C) Gráfico da dependência de $i(\mu\text{A})$ vs. pH. Taxa de varredura = 50 mVs^{-1}79

Figura 4: Voltamogramas cíclicos obtidos na ausência (linha preta) e na presença de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de metil paration com a primeira varredura (linha vermelha sólida) e a segunda varredura (linha vermelha tracejada). Taxa de varredura: 50 mV s^{-1} . Eletrólito de suporte: tampão Britton-Robinson (BR) pH 6,0.....80

Figura 5: (A) Voltamogramas cíclicos de metil parathion ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$) em H-BDDE em diferentes taxas de varredura (10 a 200 mV s^{-1}). (B) Gráfico da dependência de $\log i$ vs. $\log v$ e respectiva equação de regressão linear. Eletrólito de suporte: tampão BR pH 6.....81

Figura 6: (A) Figura do branco de SWV em tampão BR pH 6 (após varredura de metil paration na concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) sem e após aplicar potenciais de condicionamento (+1,0 a +2,0 V) em BDDE. (B) Curvas SWV na presença de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de metil paration e tampão BR pH 6 após aplicação do potencial de ativação (-0,5 V a -2,0 V) em BDDE. Condições SWV: Frequência: 30 Hz; Amplitude: 50 mV; Potencial de passo: 7 mV; Potencial de condicionamento (B): +2,0 V (por 15 s); Taxa de agitação: 2000 rpm.....82

Figura 7: Variação das correntes de pico ($\pm \text{SD}$, $n=3$) das curvas de SWV medidas na presença de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de metil paration e tampão BR pH 6 em função da frequência (A), passo (B) e amplitude (C). Potencial de limpeza: +2,0 V (por 15 s), Potencial de ativação: -2,0 V (por 15 s); Tempo de equilíbrio: 15 s; Taxa de agitação: 2000 rpm.....83

Figura 8: Gráfico de Pareto com base nos dados da Tabela 3 (pré concentração do metil paration por CPE).....	87
Figura 9: Otimização da concentração de Triton X-100 e a resposta analítica do MP no DDB. Condições otimizadas: tampão Britton-Robinson (BR) a 0,1 mol L ⁻¹ pH 6,0; Frequência: 30 Hz; Amplitude: 50 mV; incremento de potencial: 7 mV; Potencial de condicionamento: +2,0 V (por 15 s), Potencial de deposição: -2,0 V (por 15 s); Tempo de equilíbrio: 15 s e Velocidade de agitação: 2000 rpm.....	88
Figura 10: Voltamogramas de SWV para amostra de mel diluída diretamente em eletrólito, sem CPE (linha vermelha em A) e após tratamento otimizado da amostra de mel com CPE (linha vermelha em B). Os respectivos voltamogramas registrados para o branco são as linhas pretas. Condições estudadas na otimização (Tabela 11). Eletrólito de suporte: tampão BR pH 6. [MP] em A: 10 µmol L ⁻¹ ; [MP] em B: 1 µmol L ⁻¹	90
Figura 11: Esquerda: (A, C e E) voltamogramas (fundo corrigido) para determinação de metil paration em amostras de mel enriquecidas com soluções padrão para resultar nas seguintes concentrações finais na célula: (A) 0,25 µmol L ⁻¹ (48,4 µg kg ⁻¹), (C) 0,5 µmol L ⁻¹ (96,8 µg kg ⁻¹) e (E) 1,0 µmol L ⁻¹ (193,5 µg kg ⁻¹). 1º varredura refere-se ao eletrólito; 2ª varredura para amostras com mel; 3ª a 5ª varreduras após adição de soluções padrão de metil paration. Direita: (B, D e F) respectivas curvas analíticas (R ² =0,988 em B, R ² =0,999 em D, R ² =0,990 em F).....	95

LISTA DE TABELAS

➤ INTRODUÇÃO

Tabela 1: Classificação toxicológica dos agrotóxicos em função do DL₅₀.....4

➤ CAPÍTULO 1: EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

Tabela 1: Concentração Micelar Crítica (QUINA, 1999).....22

Tabela 2: Classificação dos surfactantes.....22

Tabela 3: Variáveis estudadas na otimização do método CPE.....29

Tabela 4: Condições cromatográficas otimizadas em HPLC/UV.....34

Tabela 5: Tempo de retenção (t_R) para os agrotóxicos em estudo.....35

Tabela 6: Estudo da influência da concentração do surfactante na etapa de extração: matriz mel com TX-100 e TX-114.....44

Tabela 7: Estudo da influência da concentração do surfactante na etapa de extração: matriz milho com TX-100 e TX-114.....45

Tabela 8: Estudo da influência do tempo de aquecimento na etapa de extração dos agrotóxicos: matriz mel com TX-100 e TX-114.....50

Tabela 9: Estudo da influência do tempo de aquecimento na etapa de extração dos agrotóxicos: matriz milho com TX-100 e TX-114.....51

Tabela 10: Parâmetros obtidos para as curvas analíticas dos agrotóxicos preparadas em solvente.....54

Tabela 11: Parâmetros obtidos para as curvas analíticas dos agrotóxicos preparadas na matriz de cada amostra empregando o método CPE (TX-100 e TX-114).....54

Tabela 12: Fatores de pré-concentração obtidos com método CPE otimizado utilizando os surfactantes TX-100 e TX-114.....55

Tabela 13: Valores de limite de quantificação (LQ) e limite máximo de resíduos (LMR) segundo o MAPA¹, EU² e CODEX ALIMENTARIUS³ para os agrotóxicos em estudo nas matrizes analisadas.....58

Tabela 14: Taxas de recuperação dos resíduos de agrotóxicos empregando o método CPE, n=6 (1º dia).....60

Tabela 15: Recuperação dos resíduos de agrotóxicos empregando o método CPE, n=6 (2º dia).....61

Tabela 16: Taxas de recuperação dos resíduos de agrotóxicos empregando o método CPE, n=6 (3º dia).....62

Tabela 17: Limites de detecção e quantificação e resultados de recuperação em variadas matrizes para os agrotóxicos analisados neste trabalho e utilizando diferentes métodos de extração e análise.....	64
Tabela 18: Taxas de recuperação dos resíduos de agrotóxicos empregando o método QuEChERS original, n=6.....	67
Tabela 19: Taxas de recuperação dos resíduos de agrotóxicos empregando o método QuEChERS modificado (citrato), n=6.....	67
Tabela 20: Amostras analisadas pelo método proposto quanto a presença e concentração de oito agrotóxicos normalmente empregados na região de Catalão-GO.....	69

➤ **CAPÍTULO 2: DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE METIL PARATION EM MEL UTILIZANDO ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO APÓS EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM**

Tabela 1: Otimização dos parâmetros SWV para a determinação de metil paration utilizando eletrodo dopado com boro pré-tratado catodicamente.....	84
Tabela 2: Características analíticas do método para determinação de metil paration usando eletrodo dopado com boro pré-tratado catodicamente.....	85
Tabela 3: Condições do estudo de extração do metil paration utilizando planejamento fatorial completo (2 ³) e os respectivos sinais analíticos obtidos pelo método CPE-SWV.....	86
Tabela 4: Características analíticas para determinação de MP com e sem CPE.....	91
Tabela 5: Valores de recuperação encontrados pelo método CPE-SWV em duas amostras de mel (A e B) fortificadas com concentração conhecida de MP.....	93
Tabela 6: Valores de recuperação obtidos pelo método CPE-SWV em duas amostras de mel enriquecidas com quantidades conhecidas de metil paration (n=3).....	94
Tabela 7: Comparação entre as características analíticas do método proposto e outros métodos eletroanalíticos relatados na literatura para determinação de MP em diferentes amostras.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATZ	Atrazina
C18	Octadecilsilano ligado quimicamente à sílica
CCD	Planejamento Composto Central (Central Composite Design)
CLP	Clorpirifós
CMC	Concentração Micelar Crítica
CPE	Extração por ponto nuvem (Cloud point extraction)
CV (%)	Coefficiente de Variação
CV	Voltametria cíclica
DDB	Diamante Dopado com Boro
DELT	Deltametrina
DIZ	Diazinon
DL50	Concentração de uma substância química que provoca a morte de 50 % de um grupo de animais expostos, em um tempo definido.
DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersivo (Dispersive liquid-liquid Microextraction)
DOE	Planejamento de Experimentos (Design of Experiments)
DPV	Voltametria de pulso diferencial (Differential pulse voltammetry)
DPR (%)	Desvio padrão relativo
dSPE	Dispersive solid-phase extraction (Extração por Fase Sólida Dispersiva)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPA	Agencia de Proteção Ambiental (Environmental Protection Agency)
EPN	Extração por Ponto Nuvem
FIPR	Fipronil
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
LD	Limite de Detecção
LLE	Extração Líquido-Líquido (Liquid-Liquid Extraction)
LLE-LTP	Extração Líquido-Líquido com Partição à Baixa Temperatura (Liquid-liquid Extraction - Low Temperature Partition)
LMR	Limite Máximo Residual
LQ	Limite de Quantificação
MALT	Malation
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MP	Metil Paration
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PSA	Amina Primária Secundária (Primary secondary amines)
QuEChERS	Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)
R%	Recuperação percentual
SPE	Extração em Fase Sólida (Solid Phase Extraction)
SWV	Voltametria de Pulso Diferencial
TPN	Temperatura de Ponto Nuvem
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency)

SUMÁRIO

➤ INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1. AGROTÓXICOS.....	1
1.1 AGROTÓXICOS ANALISADOS.....	4
❖ ATRAZINA.....	4
❖ MALATION.....	5
❖ FIPRONIL.....	5
❖ DIAZINON.....	6
❖ CLORPIRIFÓS.....	7
❖ DELTAMETRINA.....	7
❖ METIL PARATION.....	8
❖ 2,4 D.....	8
❖ DIURON.....	9
❖ CIPROCONAZOL.....	9
2. MONITORAMENTO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS NO BRASIL.....	9
3. COMPARAÇÃO COM OUTROS PAÍSES.....	11
4. AGROTÓXICOS E A AGRICULTURA.....	12
5. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS.....	13
❖ EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLE).....	14
❖ EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE).....	14
❖ DISPERSÃO EM FASE SÓLIDA DE MATRIZ (MSPD).....	15
❖ MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME).....	15
❖ EXTRAÇÃO RÁPIDA, FÁCIL, BARATA, EFICAZ, ROBUSTA E SEGURA (QUECHERS).....	16
❖ OUTROS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	16
6. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS.....	17
❖ CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (LC).....	17
➤ CAPÍTULO 1: EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS	
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	25

2.1. GERAL.....	25
2.2. ESPECÍFICO.....	25
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	25
3.1. INSTRUMENTAÇÃO.....	25
3.2. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	26
3.3. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DE ANÁLISE.....	26
3.4. PREPARAÇÃO DAS MATRIZES DAS AMOSTRAS DE ALIMENTO EM ESTUDO.....	27
3.5. EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM.....	27
3.5.1. INFLUÊNCIA DO pH NA ETAPA DE EXTRAÇÃO.....	27
3.5.2. SELEÇÃO DAS VARIÁVEIS UTILIZADAS NO MÉTODO CPE.....	28
3.5.3. CURVA DE CALIBRAÇÃO COM E SEM CPE: FATOR DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO.....	29
3.5.4. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS EMPREGANDO O MÉTODO QUECHERS PADRÃO E MODIFICADO (QUECHERS ACETATO).....	30
3.5.6. FIGURAS DE MÉRITO AVALIADAS.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	34
4.2. PREPARAÇÃO DAS MATRIZES DAS AMOSTRAS DE ALIMENTO EM ESTUDO.....	36
4.3. INFLUÊNCIA DA VARIÁVEL pH NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO.....	38
4.4. OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM.....	41
4.4.1 CONCENTRAÇÃO DE SURFACTANTE (TX-100 E TX-114).....	41
4.4.2 CONCENTRAÇÃO DO ELETRÓLITO (NaCl) NA ETAPA DE EXTRAÇÃO...	46
4.4.3 ESTUDO DO TEMPO DE AQUECIMENTO NA CPE.....	48
4.5. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA CPE DESENVOLVIDA.....	52
4.5.1 SELETIVIDADE.....	52
4.5.2 FAIXA DE TRABALHO E LINEARIDADE.....	53
4.5.3 EFEITO MATRIZ.....	56
4.5.4 LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO E DE DETECÇÃO APÓS CPE.....	57
4.5.5 EXATIDÃO E PRECISÃO (RECUPERAÇÃO).....	59
4.6. MÉTODO QUECHERS ORIGINAL E ACETATO.....	66
4.7. COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS PELO MÉTODO QUECHERS ORIGINAL E ACETATO E O MÉTODO CPE-HPLC/UV PROPOSTO.....	68

4.8. APLICAÇÃO DO MÉTODO CPE-HPLC/UV PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE MILHO E MEL.....	69
5. CONCLUSÃO.....	70

➤ **CAPÍTULO 2: DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE METIL PARATION EM MEL UTILIZANDO ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO APÓS EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM**

1. INTRODUÇÃO.....	71
2. OBJETIVOS.....	73
2.1. GERAL.....	73
2.2. ESPECÍFICO.....	73
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	73
3.1. INSTRUMENTAÇÃO, CÉLULA ELETROQUÍMICA E ELETRODOS.....	73
3.2. REAGENTES E AMOSTRAS.....	74
3.3. MEDIÇÕES ELETROQUÍMICAS.....	75
3.4. PREPARAÇÃO DE AMOSTRA.....	75
3.5. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM.....	76
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
4.1. OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO ELETROANALÍTICO PARA A ANÁLISE DE METIL PARATION.....	78
4.2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM.....	85
4.3. CALIBRAÇÃO E COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS COM E SEM EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM.....	89
4.4. APLICAÇÃO DO MÉTODO CPE-SWV PARA DETERMINAÇÃO DE METIL PARATION EM AMOSTRAS DE MEL.....	92
4.5. SELETIVIDADE (ESTUDO DE INTERFERÊNCIA).....	96
5. CONCLUSÃO.....	101
➤ REFERÊNCIAS.....	102

INTRODUÇÃO

1. AGROTÓXICOS

O uso de agrotóxicos no combate as pragas e doenças na agricultura é uma prática antiga baseada na utilização de substâncias de origem natural como o piretro e a nicotina e espécies inorgânicas contendo mercúrio, enxofre ou cobre (BAIRD, CANN, 2011; ZANELLA et al., 2011). Apesar de ter como finalidade o combate as pragas, os agrotóxicos foram utilizados durante anos como armas químicas em diversas guerras como a da Coreia e do Vietnã, por exemplo, sendo denominados nesse caso de “agente laranja” (desfolhante que dizimou milhares de soldados e civis, além de ter contaminado rios e mares). Com o fim das guerras e um mercado saturado de agrotóxicos, as lavouras tornaram-se o novo mercado consumidor das substâncias químicas enquadradas nessa classe (LONDRES, 2011).

O uso maciço de agrotóxicos se intensificou a partir de 1950 com a chamada 'Revolução Verde', programa incentivado pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (Food and Agriculture Organization - FAO). Nesse período iniciaram-se medidas de expansão da produtividade agrícola com intuito de minimizar os índices de fome pelo mundo com foco em países com baixo subsídio industrial, tais como Brasil e Índia. Nesse sentido, os países participantes deveriam adotar medidas de intensificação de uso de agrotóxicos no setor agrícola, eliminando qualquer praga que limitasse o aumento da produção agrícola (GRIGG, 2001; LONDRES, 2011).

No Brasil, esse movimento chega na década de 1960 e, com a implantação do Programa Nacional de Defensivos Agrícolas (PNDA), ganha impulso na década de 1970. O programa vinculava a utilização dessas substâncias à concessão de créditos agrícolas, sendo o Estado um dos principais incentivadores dessa prática (SIQUEIRA, MOURA, CARNEIRO, 2013; SOUZA, MEDEIROS, SOUZA, 2011; JOBIM, NUNES, GIUGLIANI, 2010).

Devido a intensificação do uso de agrotóxicos, leis e regras foram criadas em relação ao uso dessas substâncias. Neste contexto, o termo agrotóxico passou a ser adotado no Brasil a partir da Lei Federal nº 7.802, de 1989, regulamentada pelo Decreto nº 4.074, de 2002, e traz o seguinte conceito (BRASIL, 2002):

“Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e 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, bem como as substâncias de produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.”

Outros sinônimos utilizados na literatura científica para classificar os agrotóxicos são: defensivos agrícolas, pesticidas ou praguicidas. São considerados produtos naturais ou sintéticos que atuam sobre pragas, ervas e fungos na produção agrícola (VELASCO; CAPANEMA, 2006); substâncias com ação biológica que têm por finalidade defender as plantas de algum agente nocivo (EMBRAPA, 2004); substâncias químicas utilizadas para prevenir, combater ou controlar uma praga, podendo ser denominadas como praguicidas ou pesticidas (MARTINS et al., 2010); ainda segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, United States Environmental Protection Agency), agrotóxico é qualquer substância ou mistura de substâncias que tem por finalidade prevenir, destruir, desfolhar, dessecar, estimular ou inibir o crescimento, repelir ou mitigar qualquer peste animal ou vegetal (EPA, 2019).

Em relação às classificações, os agrotóxicos podem ser considerados em relação a forma de atuação; persistência no ambiente; espécie de organismo que se pretende eliminar ou controlar; estrutura química das substâncias ativas; grau de toxicidade, periculosidade, entre outros (FENINK; TANKIEWICZ; BIZIUK, 2011).

Considerando a ação específica os agrotóxicos são classificados em: praguicidas (combatem pragas em geral), fungicidas (destroem ou inibem fungos), herbicidas (agem impedindo o crescimento de ervas daninhas), raticidas (combatem ratos e outros roedores), acaricidas (agem sobre ácaros), moluscocidas (agem sobre moluscos), algicidas (eliminam algas), inseticidas (controlam insetos) desfolhantes (eliminam folhas indesejadas), fumigantes (combatem bactérias do solo), nematicidas (combatem nematóides), escorpionicidas (utilizado no combate aos escorpiões) e vampiricidas (ação de combate aos morcegos) (PERES et al., 2007).

Em relação aos grupos químicos presentes nas moléculas considera-se a seguinte classificação:

✓ **Organoclorados:** Compostos sintéticos com baixa solubilidade em água e elevada solubilidade em solventes orgânicos. Possui alta estabilidade, apresentando-se por décadas no ambiente de uso. Por ter afinidade por lipídeos se acumula no organismo ocorrendo a biomagnificação. Têm efeito no sistema endócrino e podem afetar atividade

hormonais causando danos em vários sistemas corporais (SÁ et al., 2012; CAMPOS et al., 2015; TREZZI et al. 2001; FENIK; TANKIEWICZ; BIZIUK, 2011).

✓ **Organofosforados:** São compostos formados de ésteres do ácido fosfórico e apresentam um alto grau de toxicidade, uma vez que, atuam como inibidores da enzima acetilcolinesterase responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos. Esta enzima hidrolisa a acetilcolina que quando acumulada, causa um colapso no sistema nervoso central, ocasionando perda do controle muscular, convulsões, podendo levar à morte por parada cardiorrespiratória (DA SILVA et. al, 2008; PETRONILHO et al., 2011; SCHENK et al., 2016).

✓ **Carbamatos:** Também são conhecidos como uretanos são derivados do ácido carbâmico. Sua toxicidade é aguda e também agem no sistema nervoso central, inibindo a enzima acetilcolinesterase, levando ao acúmulo da acetilcolina (HORTELLANI, 2012; MA et al., 2014).

✓ **Piretróides:** É uma classe de agrotóxicos natural, que é encontrada em crisântemos (Flor) mas também podem ser produzidos sinteticamente através das piretrinas. Tais compostos são fotoestáveis, de fácil desintegração e pela cadeia alimentar podem acarretar a bioacumulação nos organismos. São utilizados como uma alternativa aos organoclorados e organofosforados (QUERINO, 2000; SANTOS et al., 2008; ROMANINI, et al., 2011; AMWEG, WESTON, UREDA, 2005).

✓ **Triazinas:** São compostos tóxicos que contaminam água e solo, possuem lenta degradação e apresentam efeitos tóxicos, tais como defeitos congênitos, problemas respiratórios e potencialmente carcinogênicas (PATUSSI et al., 2013).

✓ **Compostos inorgânicos:** apresentam em sua estrutura arsênio, talio, bário, cádmio, ferro, selênio, chumbo, cobre, mercúrio e zinco (CONWAY, 2003; BAIRD, 2002).

Em termos de toxicidade os agrotóxicos são classificados no Brasil de acordo com a dose letal (LD₅₀), ou seja, a dose de uma substância química que provoca a morte de, pelo menos, 50% das espécies estudadas, quando administrada pela mesma via, por exemplo, oral. Os agrotóxicos são classificados como tóxicos, quando estes produtos comprovarem, por dados validados, serem teratogênicos, mutagênicos, carcinogênicos ou genotóxico, além de levarem à corrosão, ulceração ou opacidade na córnea, dos animais testados pela ANVISA, (ANVISA, 2016). Na Tabela 1, está demonstrado como a ANVISA classifica os agrotóxicos, de acordo com as formulações sólidas, que apresentam DL₅₀ administrada por via oral em ratos, sendo representada em mg kg⁻¹ de massa viva.

Tabela 1: Classificação toxicológica dos agrotóxicos em função do DL₅₀. (ANVISA, 2016).

Classe toxicológica	Descrição	Faixa indicativa de cor
I	Extremamente tóxicos (DL ₅₀ ≤ 5 mg/kg de massa viva)	Vermelho vivo
II	Altamente tóxicos (5 < DL ₅₀ ≤ 50 mg/kg de massa viva)	Amarelo intenso
III	Moderadamente tóxicos 50 < DL ₅₀ ≤ 500 mg/kg de massa viva	Azul intenso
IV	Pouco tóxicos (DL ₅₀ > 500 mg/kg de massa viva)	Verde intenso

Do ponto de vista toxicológico, em 2018 ocorreu uma reclassificação dos agrotóxicos. A ANVISA avaliou 1.942 produtos e desses um total de 1.924 foram reclassificados e redistribuídos em 5 categorias, diferente da classificação anterior em que se observava apenas 4 categorias (ANVISA, 2018):

- Categoria 1: Produto Extremamente Tóxico – faixa vermelha.
- Categoria 2: Produto Altamente Tóxico – faixa vermelha.
- Categoria 3: Produto Moderadamente Tóxico – faixa amarela.
- Categoria 4: Produto Pouco Tóxico - faixa azul.
- Categoria 5: Produto Improvável de Causar Dano Agudo – faixa azul.
- Não classificado – Produto Não Classificado – faixa verde.

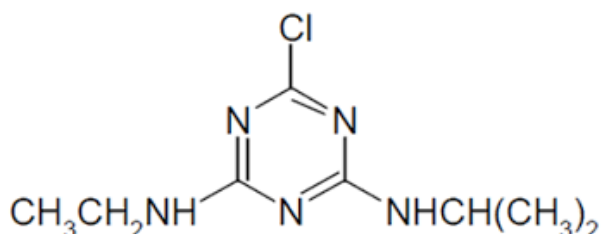
1.1 AGROTÓXICOS ANALISADOS

❖ ATRAZINA

A atrazina é um herbicida pertencente a família das triazinas. É um composto polar, com peso molecular de 215,7 g mol⁻¹, fórmula molecular C₈H₁₄ClN₅ e solubilidade moderada em água (33,0 mg L⁻¹) (FAN, SONG, 2014). É um herbicida sistêmico amplamente utilizado nas culturas de milho, sorgo e cana-de-açúcar (SENE et al., 2010). Esse agrotóxico pode causar danos no DNA de organismos aquáticos e interferir no equilíbrio de ecossistemas

(CAVAS, 2011). A exposição a atrazina em longo prazo está associada ao aumento do risco de câncer de ovário e mama em humanos (SANDERSON et al., 2000). A atrazina é considerada um poluente, pois apresenta baixa biodegradabilidade (SENE et al., 2010) e alta persistência (ZHANG et al., 2012). A absorção da atrazina em animais e em humanos pode ocorrer pelas vias dérmica, oral e inalatória. A estrutura da atrazina é apresentada na Figura 1.

Figura 1: Estrutura química da atrazina.

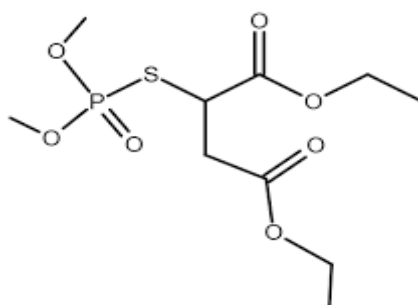


Fonte: CANEVAROLI et al., 2021.

❖ MALATION

O malation (O,O-dimetil-ditiofosfato-de-dietil-mercaptosuccinato) é um inseticida sintético da classe dos organofosforados (Figura 2) amplamente utilizado no mundo (SALER; SAGLAM, 2005). Possui massa molar de 330,4 g mol⁻¹, fórmula molecular C₁₀H₁₉O₆PS₂ e solubilidade em água de 148,0 mg L⁻¹. O malation é utilizado para o controle de pragas mundialmente e em específico no Brasil para o controle do mosquito *Aedes aegypti*, transmissor da Dengue (COLEONE, 2014; GOMES, 2014). Nos seres humanos atua como inibidor da acetilcolinesterase, sendo amplamente utilizado nas culturas de algodão, soja e tomate (ANVISA).

Figura 2: Estrutura química do malation.

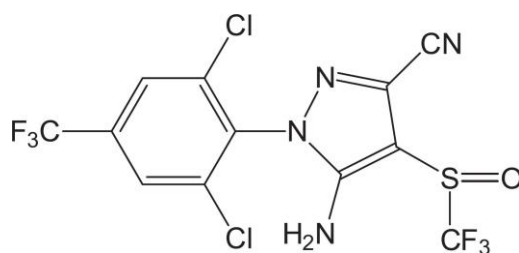


Fonte: FISCHER, 2021.

❖ FIPRONIL

O fipronil (Figura 3) é um inseticida pertencente a classe química fenilpirazol sendo utilizado em mais de 100 diferentes tipos de culturas. Esse agrotóxico apresenta ampla aplicação que vai do controle de formigas a pragas na raiz do milho (TINGLE et al., 2021). O fipronil em sua forma pura é um pó branco de massa molar de 437 g mol^{-1} , fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_4\text{Cl}_2\text{F}_6\text{N}_4\text{OS}$ e solubilidade em água de $2,4 \text{ mg L}^{-1}$ (BASF, 2021). É um agrotóxico utilizado em culturas de milho, soja, algodão, batata e cana de açúcar (ANVISA), atuando nas células nervosas dos insetos, que morrem de hiperexcitação.

Figura 3: Estrutura química do fipronil.

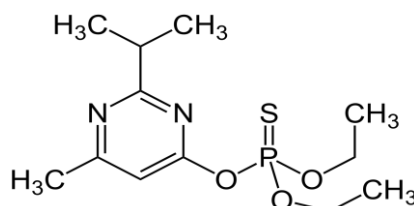


Fonte: CECÍLIA, 2015.

❖ DIAZINON

O Diazinon (Figura 4) é um organofosforado considerado inseticida e acaricida. Possui peso molecular de $304,3 \text{ g mol}^{-1}$, solubilidade de $40,0 \text{ mg L}^{-1}$ e fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3\text{PS}$. Usado na agricultura para controle de insetos no solo e folhagens, e pestes numa variedade de frutas, vegetais e nozes. No uso veterinário é indicado para o controle da mosca-do-chifre e mosca doméstica em instalações rurais. A exposição ao praguicida provoca uma série de efeitos tóxicos em animais experimentais como: disfunção do fígado, mudanças estruturais de proteínas, alterações nas enzimas hepáticas, inchaço das mitocôndrias nos hepatócitos, produção de radicais livres, depleção de antioxidantes e a indução de estresse oxidativo, além de causar dano celular e alterações no sistema neurológico, rins e pâncreas (EZZI et al., 2016; NAJI; HEIDARIAN; SAMANI, 2017; HADICHEGENI et al., 2018).

Figura 4: Estrutura química do diazinon.

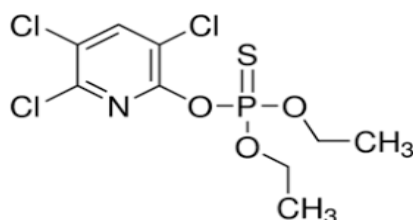


Fonte: BUDAVARI, 2016.

❖ CLORPIRIFÓS

O clorpirifós é um inseticida organofosforado fabricado e comercializado desde 1965 pela Dow Company nos Estados Unidos (DOW AGROSCIENCE, 2021). Possui peso molecular de $350,6 \text{ g mol}^{-1}$, solubilidade de $1,05 \text{ mg L}^{-1}$ e fórmula molecular $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{Cl}_3\text{NO}_3\text{PS}$, sendo utilizado frequentemente nas culturas de algodão, café, feijão, milho, citrus, couve e repolho. Na cultura de milho a aplicação desse agrotóxico visa combater lagarta do cartucho e lagarta rosca (DOW AGROSCIENCE, 2021). A estrutura do cloririfós é apresentada na Figura 5.

Figura 5: Estrutura química do clorpirifós.

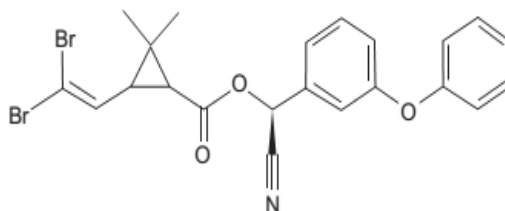


Fonte: PINTO, 2017.

❖ DELTAMETRINA

A deltametrina (Figura 6) é um inseticida piretróide muito comum em repelentes e inseticidas domésticos. É muito utilizado nas culturas de cereais, grãos, café e feijões secos (KATSUDA, 2012; FARGHALY; ZAYED; SOLIMAN, 2013). Possui peso molecular de $505,2 \text{ g mol}^{-1}$, solubilidade em água de $0,0002 \text{ mg L}^{-1}$ e fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{Br}_2\text{NO}_3$. Chargui et al. (2012) avaliaram as alterações bioquímicas e histopatológicas em ratos Wistar submetidos a administração diária de deltametrina por via subcutânea observando um aumento significativo das transaminases, além de alterações histopatológicas no rim e fígado dos animais tratados e concluíram que a deltametrina pode ser hepatotóxica e nefrotóxica em ratos.

Figura 6: Estrutura química da deltametrina.

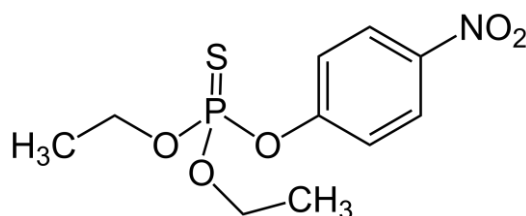


Fonte: LOSANO, 2015.

❖ PARATIONA METÍLICA

O metil paration (Figura 7) é um inseticida e acaricida da classe dos organofosforados utilizado principalmente na cultura da batata, assim como nas culturas de algodão, cebola, feijão, milho, soja e trigo (ANVISA). Possui peso molecular de 263,23 g mol⁻¹, fórmula molecular C₁₀H₁₄NO₅PS e solubilidade de 55 mg L⁻¹. O metil paration pode ser absorvido pela pele e tratos respiratórios e gastrointestinais, atuando na inibição irreversível da atividade da acetilcolinerase no sistema nervoso (EDWARDS; TCHOUNWOU, 2005).

Figura 7: Estrutura química do metil paration.

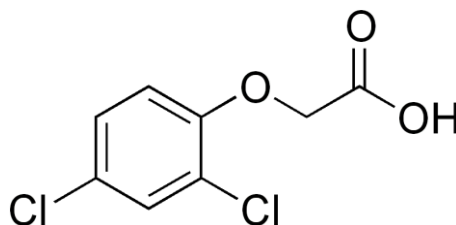


Fonte: OKUMURA; SACZK; OLIVEIRA, 2011.

❖ 2,4 D

O herbicida ácido 2,4 diclorofenoxiacético (C₈H₆Cl₂O₃) é utilizado no controle de plantas daninhas em pós-emergência e dessecação (FU et al., 2009). Este herbicida de caráter sistêmico atinge todas as partes da planta provocando distúrbios bioquímicos (HERTWING, 1983). Possui peso molecular de 221,04 g mol⁻¹ e solubilidade em água de 600 mg L⁻¹. Este herbicida (Figura 8) é muito usado em plantações de trigo, arroz, milho, sorgo e principalmente cana de açúcar (ANVISA).

Figura 8: Estrutura química do 2,4 D.

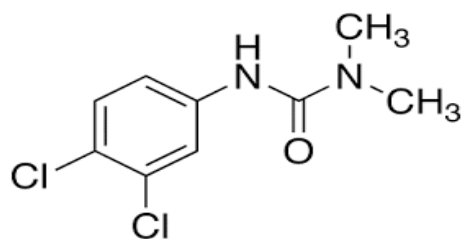


Fonte: TAYEB et al., 2013.

❖ DIURON

O herbicida Diuron possui fórmula molecular $C_9H_{10}Cl_2N_2O$ (Figura 9), sendo utilizado no controle de plantas daninhas em várias culturas como cacau, batata, alho, cebola, milho, cana-de-açúcar, algodão, abacaxi, seringueira, café, chá, entre outros (ANVISA; MUSUMECI et al., 1995). Possui peso molecular de $233,1 \text{ g mol}^{-1}$ e solubilidade de $35,6 \text{ mg L}^{-1}$.

Figura 9: Estrutura química do diuron.

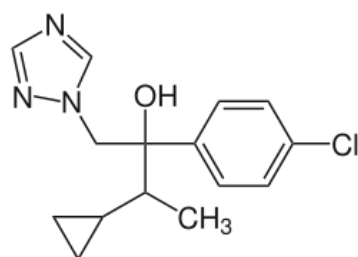


Fonte: SOUSA, 2016.

❖ CIPROCONAZOL

O ciproconazol (Figura 10) é um fungicida do grupo químico triazol e é utilizado nas culturas de arroz, algodão, alho, café, milho, soja, feijão, goiaba, entre outras (ANVISA). Possui fórmula molecular $C_{15}H_{18}ClN_3O$, peso molecular de e solubilidade em água de 93 mg L^{-1} (ANDRADE et al., 2011).

Figura 10: Estrutura química do ciproconazol.



Fonte: ANVISA, 2022.

2. MONITORAMENTO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS NO BRASIL

A aprovação de agrotóxicos no Brasil tem se intensificado desde 2016. Somente nos últimos três anos, foram feitos 1.529 novos registros, sendo 562 somente em 2021. O processo de registro e liberação de agrotóxicos no Brasil envolve vários órgãos, destacando-se

o Ministério da Saúde que através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece os Limites Máximos de Resíduos de agrotóxicos (LMR) que são calculados considerando experimentos de campo para cada cultura, a Ingestão Diária Aceitável (IDA), a toxicidade do composto para seres humanos e o limite de quantificação dos métodos instrumentais de análises (ANVISA, 2016; FERMAM; ANTUNES, 2009).

Além da ANVISA (responsável por analisar os riscos da substância e fazer a avaliação toxicológica do produto), outros dois órgãos também são responsáveis pelas etapas de registro de um agrotóxico: o IBAMA (responsável por fazer a avaliação ecotoxicológica das novas substâncias) e o MAPA (responsável por analisar a eficiência agrônômica da nova substância, considerando seu custo benefício para o setor). Após a aprovação dos três órgãos envolvidos, que fazem sua análise de forma autônoma, na chamada tripla análise, é emitido pelo Comitê Técnico de Assessoramento de Agrotóxicos (CTA), o registro do agrotóxico bem como são estabelecidos diretrizes e medidas que visam reduzir os efeitos danosos dos produtos a saúde humana e ao meio ambiente.

Neste contexto, a presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos necessita de um acompanhamento adequado, o qual é feito pelo Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) em 2001, criado pela Anvisa. Esse Programa tem como objetivo avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura* que são destinados a mesa do consumidor, evitando agravos a saúde da população e garantindo a segurança alimentar. Através dos resultados obtidos, estratégias são traçadas pelos órgãos responsáveis em conjunto com outras instituições com intuito de diminuir os riscos referentes a presença de resíduos não autorizados ou acima dos limites máximos (ANVISA, 2016).

No ano de 2019, o PARA divulgou os resultados do monitoramento realizado entre os anos de 2017 e 2018. Foram monitoradas 4.616 amostras de alimentos de origem vegetal. Os resultados demonstram que do total de amostras somente 3.544 (77%) foram consideradas satisfatórias quanto aos agrotóxicos pesquisados, sendo que em 2.254 (49%) amostras não foram detectados resíduos, e em 1.290 (28%) apresentaram resíduos com concentrações iguais ou inferiores ao Limite Máximo de Resíduos (LMR), estabelecido pela Anvisa. Foram consideradas insatisfatórias 1.072 amostras (23%) em relação à conformidade com o LMR (ANVISA, 2019).

3. COMPARAÇÃO COM OUTROS PAÍSES

Assim como no Brasil, outros países também possuem legislação e órgãos regulamentadores para tratar assuntos relacionados a liberação, uso e presença de agrotóxicos no meio ambiente.

A União Europeia, com o passar dos anos, tem diminuído o uso de agrotóxicos de forma gradativa, diferente do Brasil que tem intensificado o uso nos últimos anos. Na Europa, o uso de agrotóxicos tem um controle rigoroso e várias substâncias que foram confirmadas como malélicas à saúde humana e ambiental, foram proibidas. A regulação do uso de agrotóxicos dá-se pela Diretiva 2009/128/CE, a qual estabelece um quadro para utilização sustentável dos agrotóxicos, através da redução dos riscos e efeitos da utilização na saúde humana e no meio ambiente. O Regulamento nº396/2005 trata e define os limites máximos de resíduos de agrotóxicos seja na superfície ou no interior de alimentos de origem animal e vegetal destinado à alimentação humana ou animal (COMUNIDADE EUROPEIA, 2005).

Nos Estados Unidos a Agência de Proteção Ambiental (USEPA) tem como responsabilidade estabelecer os padrões para prevenir ou limitar a exposição humana aos contaminantes naturais ou antropogênicos, presentes nos sistemas públicos de abastecimento (USEPA, 2004). Os agrotóxicos estão agrupados na classe dos padrões primários (objetiva proteger à saúde pública por meio da limitação dos níveis de contaminantes na água e agrupa seis categorias, dentre as quais se encontram os agrotóxicos) e são analisados para garantir o padrão de potabilidade da água destinada a população (USEPA, 2004; USEPA, 2009).

Em relação à Comunidade Europeia, os Valores Máximos Permitido (VMP) que constavam na Diretiva de 1980 foram revisados em 1998, tendo os Guias da Organização Mundial da Saúde (OMS) como base. Os parâmetros e respectivos valores são referenciados na diretiva Drinking Water Directive 98/83/EC (COUNCIL DIRECTIVE, 1998), que é baseada nos guias da OMS e na opinião de um Comitê Científico Europeu (European Commission's Scientific Advisory Committee). Essa diretiva contempla 26 parâmetros químicos, 20 indicadores e 4 parâmetros microbiológicos. Os Estados Membros, não sendo menos rigorosos, podem seguir os preceitos desta diretiva para estabelecer seus próprios padrões de qualidade. No que concerne aos agrotóxicos, a Diretiva 98/83 estabelece os parâmetros: agrotóxico e agrotóxico total, sendo os VMP, respectivamente, 0,10 e 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$.

4. AGROTÓXICOS E A AGRICULTURA

O Brasil hoje é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo sendo que várias culturas fazem uso de agrotóxicos. O Brasil cresce no consumo e na produção de agrotóxicos gradativamente, só no ano de 2017 o Brasil produziu quase 440 mil toneladas de produtos formulados deste, mais de 8 mil toneladas foram exportadas. Isso indica que o uso de grande parte desses produtos foi utilizado na agricultura brasileira mais de 75% da produção ficou no mercado brasileiro, sem levar em consideração que o Brasil ainda importou quase 130 mil toneladas de produtos formulados.

Dentro dos principais agrotóxicos utilizados, destacam-se, de acordo com as informações da ANVISA (2019): Atrazina (herbicida), o qual é indicado para o uso em plantações de milhos, cana-de-açúcar e sorgo; Acefato (inseticida/acaricida), indicado para plantios de soja e milho, com intervalos de segurança para contato humano de quatorze (14) a vinte e um (21) dias, respectivamente; Malationa (inseticida/acaricida), com aplicação foliar (alface, morango, tomate, entre outros) e aplicação em produtos armazenados (arroz, milho e trigo); Carbofurano (inseticida/acaricida), utilizado na produção principalmente de algodão, arroz, milho, banana e feijão; 2,4-D (herbicida), com maior utilização em soja, trigo, arroz e milho; Clorpirifós (inseticida/acaricida), com a mesma aplicação do anterior, mais cevada, citros, tomate e outros; Diuron (herbicida) para cana-de-açúcar, citros, café e algodão; Mancozebe (fungicida/acaricida), indicado para arroz, feijão, citros e trigo, além de outros produtos; Tebuconazol (fungicida) destinado para plantações de cevada, soja e trigo principalmente; Glifosato (herbicida) arroz, cana de açúcar, milho, soja e trigo, além de muitas outras culturas.

Os agrotóxicos utilizados nas diversas monoculturas brasileiras possuem grande potencial de dispersão. Isso não somente na zona rural, mas também por meio de chuvas em áreas urbanizadas. A ausência de regulamentação de segurança para a presença de agrotóxicos nas águas pluviais faz com que a mensuração dos danos causados no meio ambiente seja quase impossível, afetando a biodiversidade e a saúde humana (MOREIRA et al., 2012). Como visto nas seções anteriores, boa parte dos alimentos produzidos em grande escala, dada a necessidade do aumento da produtividade com a Revolução Verde, passa por processos de utilização de agrotóxicos, visto que há discrepância entre as quantidades permitidas das substâncias na legislação brasileira em comparação com a União Europeia (GRÜTZMACHER et al., 2008). A contaminação das águas – superficiais ou subterrâneas – e

do solo pelo uso dos agrotóxicos nas monoculturas brasileiras afetam também diretamente a saúde humana.

Nesse caso, a intoxicação pode se dar por meio do manuseio das substâncias químicas por parte dos cultivadores, pois boa parte trabalha sem proteção, além da possibilidade de intoxicação pelo consumo de alimentos e da água (que possuem grandes quantidades dos agrotóxicos), afetando não somente os produtores, mas todos aqueles que necessitam desses recursos para sobreviver (STEFFEN; STEFFEN; ANTONIOLLI, 2011).

Em suma, sabe-se que a utilização dessas substâncias no cultivo de alimentos evidencia a dependência do Brasil como país agroexportador, sendo sua legislação mais flexível – frente a da União Europeia – é um fator que o torna dependente na participação do comércio internacional. Nesse sentido, o país sofre diversos impactos negativos, que vão desde problemas nos recursos naturais como o solo e, principalmente, a água, até o bem-estar dos indivíduos, devido ao atraso no desenvolvimento que o país é submetido.

5. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS

A utilização frequente e em larga escala de agrotóxicos na agricultura está relacionada ao modelo de produção agrícola convencional garantindo de forma rápida e eficiente o controle de pragas, bem como o aumento na produtividade agrícola. No entanto, resíduos desses compostos geralmente permanecem nos alimentos, nos solos, na água, etc., o que se torna um enorme problema ambiental e, principalmente, de saúde do ser humano, uma vez que podem ocasionar intoxicações agudas e/ou crônicas. Neste sentido, é necessário o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em matrizes alimentícias e ambientais, para avaliar os riscos de contaminação do ambiente e de intoxicação do ser humano.

Durante o processo de escolha de um método analítico para determinação de níveis de resíduos de agrotóxicos em matrizes alimentícias deve se considerar alguns fatores, tais como: complexidade da matriz (alimentos apresentam alto teor de lipídeos, carboidratos, proteínas, pigmentos e umidade), quantidades muito pequenas dos analitos de interesse (resíduos de agrotóxicos), o que acarreta no uso de solventes e reagentes com alto grau de pureza, definição do resíduo a ser determinado, que pode ser o próprio composto ou o composto e os seus metabólitos; diversidade de propriedades físico-químicas dos agrotóxicos.

A análise de resíduos de agrotóxicos consiste em algumas etapas básicas: preparo da amostra (extração do(s) analito(s) da matriz e remoção dos co-extrativos (limpeza), separação, identificação e quantificação do(s) composto(s) (PINHO et al., 2009). O preparo da amostra tem como objetivo converter uma matriz real em uma amostra disponível para análise por técnicas instrumentais. Nessa etapa realiza-se a extração do resíduo de agrotóxico que pode ocorrer por diferentes técnicas e metodologias. A extração é a etapa determinante na obtenção de bons resultados, pois, em se tratando de amostras complexas, como de alimentos, por exemplo, que apresentam baixas concentrações dos analitos de interesse e diversidade de constituintes da própria matriz, necessita-se de etapas prévias de preparo (RAMOS, 2012). Além da extração, a etapa de clean-up (limpeza) do extrato obtido torna-se necessário, pois é nesta etapa que os interferentes são eliminados ou reduzidos, minimizando o efeito matriz (LANÇAS, 2009). Alguns dos principais métodos utilizados na etapa de preparação da amostra para extração dos agrotóxicos em matrizes alimentícias são destacados a seguir:

✓ **Extração líquido-líquido (Liquid liquid extraction - LLE):**

É um método conhecido como extração por solvente, em que os agrotóxicos são colocados em contato com dois líquidos imiscíveis, geralmente água e solvente orgânico, tais como: diclorometano e acetato de etila (POSE-JUAN, CANCHO-GRANDE, RIAL-OTERO, & SIMAL-GÁNDARA, 2006), (LI & YUAN, 2008), (SANNINO, BOLZONI, & BANDINI, 2004) e (CABRAS et al., 2001). Nesse método de extração os agrotóxicos geralmente migram da fase aquosa para fase orgânica, ocorrendo a separação.

Em trabalho recente Timofeeva e colaboradores (2017), aplicaram o método LLE na determinação de quatro agrotóxicos (malation, diazinon, imidaclopride e triamedimefon) em amostras de suco de frutas. A detecção foi realizada por sistema analítico HPLC-MS/MS, obtendo-se limites de detecção (LD) entre 3×10^{-4} a 3×10^{-2} mg L⁻¹ com coeficiente de correlação (R²) de 0,995. O método desenvolvido apresentou boa detectabilidade e repetibilidade.

✓ **Extração em fase sólida (SPE)**

É um método bastante utilizado para extração de diferentes poluentes, incluindo os agrotóxicos. O procedimento se baseia na adsorção de analitos em sorventes sólidos devido a processos de interação entre os analitos e os sítios ativos superficiais dos sorventes. Recentemente no estudo conduzido por Farina et al. (2017), utilizou-se o método SPE que foi empregado como uma etapa de limpeza após a extração QuEChERS de 15 agrotóxicos de diferentes classes em vários vegetais. A mistura de solventes escolhida para etapa de eluição foi acetona:tolueno (3:1) e a técnica de análise utilizada foi a cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (GC-ECD, gás chromatography with electron capture detection). O limite de detecção observado ($0,02-4,5 \text{ ng g}^{-1}$) foi inferior ao MRL estabelecido pela União Europeia (UE) e o valor do coeficiente de correlação (R^2) ficou na faixa de 0,990–0,995, indicando uma boa linearidade. Em outro trabalho Liu et al. (2017), utilizou o método SPE para extrair alguns agrotóxicos organoclorados. Nesse método o material escolhido como adsorvente para extração em fase sólida foi o carbono poroso magnético derivado a partir de uma estrutura metal-orgânica bimetalica. O carbono poroso sintetizado possui alta área superficial específica. Para eluição o solvente que apresentou os melhores resultados foi o diclorometano usado para diluir os extratos antes da análise posterior com espectrômetro de massas com analisador triploquadrupolo (GC-QqQ). O método proposto detectou com sucesso os analitos apresentando LD e LQ variando entre 0,39 e 0,70 ng L^{-1} e 1,45 –2,0 ng L^{-1} , respectivamente. O método ofereceu excelente eficiência de extração, processo de extração rápido e facilidade de manuseio devido à alta porosidade e estabilidade do sorvente de material de carbono poroso derivado de MOF(metal – organic framework) bimetalico.

✓ **Dispersão em fase sólida de matriz (MSPD):**

O MSPD foi introduzido pela primeira vez por Barker, Long e Short (1989), a extração e a limpeza são integradas em uma única etapa, tornando a procedimento fácil, rápido, de baixo custo, menor perda de amostra e consumo de solvente. Esta técnica baseia-se na mistura de uma amostra com um sorvente apropriado, como Florisil, C18, alumina ou sílica, até obter uma mistura homogênea.

Wang, Xiao e Cheng (2011) utilizaram em seu trabalho o método MSPD tendo como sorvente sílica ligada ao C18 e como solvente extrator o diclorometano para extração de três

herbicidas de fenilureia em arroz. Obteve-se recuperação superior a 90%. Já no trabalho de Hu (2015) analisou-se a fenilureia em amostras de inhame.

✓ **Microextração em fase sólida (SPME):**

É um método rápido e livre de solventes, utilizado em etapas de pré-concentração da amostra. Foi introduzido por Arthur e Pawliszyn (1990) e superou muitas limitações enfrentadas por técnicas convencionais. A SPME se baseia na distribuição dos analitos de interesse presentes na amostra em uma fase estacionária ocorrendo a adsorção.

Em trabalho recente Saraji e colaboradores (2015), desenvolveram o método de SPME para a análise de alguns agrotóxicos organofosforados em amostras de vegetais, frutas e água. Nesse trabalho utilizou-se fibra de SPME revestida com nanotubos de carbono porosos-dióxido de silício (CNTs-SiO₂) nanohíbridos unidos com cromatografia gasosa-espectrometria de mobilidade iônica por descarga corona (GC/CD/IMS).

✓ **Extração rápida, fácil, barata, eficaz, robusta e segura (QuEChERS):**

A técnica de preparação de amostras QuEChERS é amplamente utilizada para extração de multiresíduos de agrotóxicos principalmente em matrizes alimentícias. Este método foi descrito pela primeira vez por Anastassiades, Lehotay, Stajnbaher e Schenck (2003) sendo adequado para extrair tanto compostos polares quanto apolares simultaneamente.

Uma aplicação recente do método QuEChERS foi conduzida por Machado, Pistón, Heinzen e Cesio (2017). Nesse trabalho detectaram 98 resíduos de agrotóxicos em amostras de frutas usando os sistemas analíticos GC-MS e LC-MS/MS. Os valores de LD obtidos estavam na faixa de 0,005 a 0,025 e 0,003– 0,015 mg kg⁻¹ e as recuperações obtidas ficaram entre 70 a 120%.

Konatu, Breitzkreitz e Jardim (2017) utilizaram o método de extração QuEChERS acoplado ao sistema de detecção LC-MS/MS para extrair e quantificar agrotóxicos em amostras de alface. Nesse método utilizou-se solvente extrator, sais de partição e sais de limpeza. Os resultados apresentaram boa seletividade, exatidão e precisão. Os LQ obtidos foram de 5 µg kg⁻¹ e as recuperações ficaram na faixa de 70–120% e RSD ≤20%.

✓ **Outros métodos de extração:**

Outros métodos de extração de agrotóxicos são abordados na literatura científica destacando-se: microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) (FARAJZADEH & MOGADDAM, 2016; WANG, YOU, MEI, LIU E HE, 2016), microextração em fase líquida de fibra oca (HF-LPME) (GONZÁLEZ-CURBELO, HERNÁNDEZ-BORGES, BORGES-MIQUEL, & RODRÍGUEZDELGADO, 2013), microextração de gota única (SDME) (AMDE, TAN, LIU E LIU, 2015; SALEMI, RASOOLZADEH, NEJAD E VOSOUGH, 2013), microextração de fluxo contínuo (CFME) (WU et al., 2016), combinação de SPE e DLLME (AHMADI et al., 2014; SHAMSIPUR et al., 2016) e extração de líquido sólido (SLE) (COSTA, QUEIROZ, NEVES, DE SOUSAA, & ZAMBOLIM, 2015); extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT); dispersão da matriz em fase sólida (MSPD); microextração em fase sólida (SPME); extração sortiva em barra de agitação (SBSE); microextração por sorvente empacotado (MEPS).

6. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS

Após a escolha do método de extração mais adequado a próxima etapa é a detecção dos analitos de interesse. A escolha da técnica a ser utilizada na detecção dos agrotóxicos nos extratos de alimentos dependerá de alguns fatores como, por exemplo, a estrutura química do composto a ser analisado e a finalidade da análise (sensibilidade e especificidade). As técnicas cromatográficas (CG e HPLC) são as preferidas para detecção de resíduos de agrotóxicos (MIDIO; MARTINS, 1997; SILVA, 2008).

A cromatografia é uma técnica que tem por objetivo realizar a separação de componentes presentes em uma amostra, pela distribuição entre fase estacionária (FE) e uma fase móvel (FM), considerando as propriedades físico-químicas dos analitos que serão separados (REBELO, 2014). Nas análises multirresíduos de agrotóxicos em alimentos, ou seja, análises de amostras que possuem uma mistura de vários componentes em uma matriz complexa, utilizam-se para detecção dos resíduos de agrotóxicos tradicionalmente a cromatografia gasosa ou a cromatografia líquida (SOARES, 2011; SILVA, 2008).

✓ Cromatografia líquida (LC)

É uma técnica aplicada como método de separação e determinação de agrotóxicos de alta polaridade e não voláteis e/ou termicamente lábeis, diferentemente da cromatografia

gasosa, possibilitando que os analitos permaneçam solubilizados, favorecendo a determinação dos compostos sintéticos (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é bastante utilizada e viável para ser combinado com diferentes detectores. O cromatógrafo líquido geralmente encontra-se acoplado aos detectores clássicos, como o UV, fluorescência e arranjo de diodos (DAD) (TADEO, SÁNCHEZBRUNETE, ALBERO, & GARCÍA-VALCÁRCEL, 2010).

Outro detector utilizado em conjunto com a cromatografia líquida é o MS, o qual apresenta alta sensibilidade e seletividade sem necessidade de derivatização do analito de interesse.

A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) tornou-se uma ferramenta bastante utilizada na detecção de pesticidas em alimentos e para superar algumas desvantagens deste método, foi elaborada a técnica MS/MS, com detectores acoplados, que apresenta como vantagem maior detectabilidade e sensibilidade do que o quadrupolo único, pois garante que o íon precursor selecionado fragmente nos íons produtos, o que possibilita a análise de vários tipos de pesticidas simultaneamente e a detecção e confirmação desses compostos em concentrações pequenas (MARTÍNEZ VIDAL, PLAZA-BOLANOS, ROMERO-GONZÁLEZ, & FRENICH, 2009). Embora seja uma técnica convencional para determinação de agrotóxicos em alimentos, muitas vezes, para uma detecção mais adequada será necessária uma etapa de concentração para aumentar a sensibilidade de detecção.

As fases estacionárias encontradas nas colunas utilizadas em cromatografia líquida variam conforme as interações que devem ocorrer com os componentes da amostra (interação hidrofílica, hidrofóbica e troca iônica). O C18 (Octadecil), por exemplo, é uma fase estacionária apolar (ARAÚJO, 1999). A fase móvel pode ser composta por água, tampão, acetonitrila, hexano, clorofórmio, propanol, entre outros. A combinação de solventes miscíveis é geralmente utilizada. É recomendado o uso de solventes com alto grau de pureza e deve apresentar características como capacidade de dissolver a amostra, compatibilidade com o detector (ARAÚJO, 1999).

EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

1. INTRODUÇÃO

A determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes alimentares ainda é um grande desafio, devido a pequena quantidade dos analitos de interesse presente nas amostras e grandes quantidades de substâncias interferentes que podem ser coextraídas e, na maioria dos casos, afetar os resultados de uma análise. Nesse sentido, o método de preparo de amostras é fundamental para obtenção de resultados eficientes e confiáveis (WILKOWSKA; BIZIUK, 2011).

Apesar da ampla possibilidade de métodos de preparo de amostras que possibilitem uma eficiente extração de agrotóxicos em alimentos, alguns métodos se tornaram oficiais ao longo dos anos. Um desses métodos é o QuEChERS (acrônimo do inglês para Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) que além de ser indicado e utilizado por órgãos fiscalizadores e reguladores como o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), tem sido aplicado na extração de resíduos de agrotóxicos em diferentes matrizes (PRESTES et al., 2009; PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011; LEHOTAY, 2011; REJCZAK; TUZIMSKI, 2015; GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2015; REJCZAK; TUZIMSKI, 2017).

O método QuEChERS foi desenvolvido como procedimento de preparo de amostras para extração de resíduos de agrotóxicos em diferentes matrizes e apresenta como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, além de explorar as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011). O método baseia-se em algumas etapas:

✓ Inicialmente realiza-se a extração dos agrotóxicos de diferentes polaridades utilizando os solventes acetonitrila, acetona, acetato de etila, entre outros. Geralmente, o solvente mais utilizado é a acetonitrila por possibilitar a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra (ceras, gorduras e pigmentos) (MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY; LIGHTFIELD, 2005). Além disso, a acetonitrila proporciona a extração de uma ampla faixa de agrotóxicos com diferentes polaridades e, quando acidificada, permite recuperações satisfatórias de analitos que geralmente apresentam problemas de estabilidade. Outra grande vantagem é a fácil adequação da acetonitrila para LC-MS/MS se comparado a

acetona e acetato de etila e pode ser utilizada sem problemas em análise por GC-MS/MS (MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY; LIGHTFIELD, 2005; PAYÁ et al., 2007).

✓ Após extração inicia-se a partição promovida pela adição de sais (ex. sulfato de magnésio, $MgSO_4$, e cloreto de sódio, $NaCl$), causando o efeito “*salting out*” diminuindo a solubilidade dos analitos na fase aquosa. O sulfato de magnésio ($MgSO_4$) apresenta os melhores resultados quanto a remoção de água. Além disso, sua hidratação baseia-se em uma reação exotérmica propiciando o aquecimento da amostra e facilitando a extração/partição de compostos apolares (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

✓ Na última etapa realiza-se a limpeza do extrato em fase sólida dispersiva (do inglês, Dispersive Solid Phase Extraction, dSPE). Os principais sorventes utilizados nessa etapa são o octadecilsilano (C18), carvão ativado, amina primária e secundária (PSA, do inglês primary secondary amine) e o $MgSO_4$ para remoção de água residual obtendo um extrato final de menor polaridade, facilitando assim a precipitação de co-extrativos polares. O uso de sorventes tem como objetivo reter os interferentes presentes na matriz possibilitando a obtenção, ao final, de extratos límpidos e prontos para serem injetados em sistema cromatográfico (PRESTES et al., 2009).

Apesar da ampla utilização do método QuEChERS na extração de agrotóxicos em diferentes matrizes, alguns estudos mostraram que certos compostos apresentavam problemas de estabilidade e/ou recuperação de acordo com o pH da matriz (LEHOTAY; MASTOVSKÁ; LIGHTFIELD, 2005; ANASTASSIADES et al., 2007). Para solucionar esse problema Lehotay (2011), propuseram a adição de uma etapa de tamponamento com o objetivo de melhorar os percentuais de recuperação (70-120%). O método original foi modificado e surgiu o método “QuEChERS acetato” no qual o efeito tamponante (pH 4,8) é promovido pela adição de acetato de sódio. Este método foi adotado em 2007 como método oficial da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2007) para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

Em relação a aplicação do método QuEChERS (original e acetato), Hernández-Borges et al. (2009) em seu trabalho determinou 11 agrotóxicos em amostras de banana utilizando o método QuEChERS e detecção por GC-NPD – nitrogen – phosphorous detector (detector de nitrogênio e fósforo). O limite de quantificação estava na faixa de 0,01 a 0,14 $mg\ kg^{-1}$, e a recuperação entre 67 e 118%. Em outro trabalho o método QuEChERS foi utilizado na extração de 36 agrotóxicos em amostras de mel com posterior quantificação por GC-ECD e GC-NPD. Obteve-se recuperação entre 70 e 120% (BARAKAT et al, 2007).

Os inseticidas diflubenzurona e triflumurona foram extraídos de amostras de tomate empregando-se o método QuEChERS com posterior determinação por LC acoplada a sistema de fotoderivatização pós-coluna com detector de quimioluminescência. A recuperação ficou entre 79,7 e 94,2% e os valores de LD na faixa de 0,05 a 0,26 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e valores de LQ entre 10 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (LEHOTAY, 2007).

Albarnaz (2021), desenvolveram um método analítico eficaz para determinação de multiresíduos de agrotóxicos em amostras de suco de uva integral. Os compostos de interesse foram extraídos utilizando o método QuEChERS, com posterior detecção por LC-MS/MS. O limite de quantificação do método (LQ) variou de 5 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. e os valores de recuperação ficaram acima de 70%.

Apesar de apresentar resultados eficientes na aplicação em diferentes matrizes, o método QuEChERS apresenta limitações, tais como: necessidade de utilização de grande volume de solvente, em sua maioria tóxicos, necessidade de várias etapas de extração, elevado custo de alguns reagentes e a utilização específica para técnicas acopladas a espectrometria de massa. Neste contexto, outros métodos analíticos tem sido desenvolvidos afim de superar tais limitações e propiciar resultados mais satisfatórios que aqueles obtidos utilizando o método QuEChERS.

Um método que vem ganhando destaque na literatura científica para análise de compostos orgânicos em diferentes matrizes é a Extração por Ponto Nuvem (do inglês, Cloud Point Extraction - CPE). Essa técnica foi inserida por Watanabe e Tanaka em 1978, na qual uma solução aquosa contendo o analito é colocada em contato com um surfactante e por influência da temperatura, força iônica do meio e pressão ocorre o surgimento da turbidez (efeito ponto nuvem). A CPE é simples, de baixo custo e não utiliza solventes tóxicos, se enquadrando dentro dos requisitos da química verde. Uma vantagem é a possibilidade de extração de substâncias de caráter polar e apolar presentes tanto em amostras de menor complexidade (água, por exemplo), quanto em amostras complexas (alimentos e fluidos biológicos, por exemplo) (BAZEL et al., 2017).

O método de extração por ponto nuvem está fundamentado no fato dos surfactantes terem uma faixa específica de concentração conhecida como concentração micelar crítica (CMC) onde inicia-se a formação de micelas. Abaixo da CMC, o surfactante está predominantemente na forma de moléculas não associadas. Porém quando a CMC é ultrapassada, o processo de formação de agregados micelares é favorecido, dentro de uma dinâmica de equilíbrio com suas próprias moléculas individuais, indicando que as micelas não

são estruturas estáticas e são termodinamicamente estáveis. Contudo, podem ser destruídas pela diluição com água quando a concentração do surfactante estiver abaixo da CMC (YADZI, 2011).

Na etapa de formação das micelas do surfactante após alcançar a temperatura de ponto nuvem observa-se a separação de duas fases, uma hidrofóbica (rica em surfactante) contendo o analito de interesse extraído e uma fase hidrofílica (pobre em surfactante) (WATANABE; TANAKA, 1978). Cada surfactante apresenta um valor de concentração micelar crítica característico que depende, principalmente, da estrutura do composto e é afetado pelas propriedades do solvente, temperatura de ponto nuvem e presença de outras substâncias, como eletrólitos fortes (KAREL; IRENA, 2006). Na Tabela 1 é observado os valores de CMC e a temperatura de ponto nuvem de alguns surfactantes.

Tabela 1: Concentração Micelar Crítica (QUINA, 1999).

Surfactante	CMC (mmol L⁻¹)	Temperatura de ponto nuvem (°C)
Triton X – 100	0,17 – 0,30	64 – 65
Triton X – 114	0,20 – 0,35	23 – 25
PONPE 7,5	0,085	5 – 20
PONPE 10	0,07 – 0,085	62 – 65
Genapol X - 80	0,05	42

Além da concentração micelar crítica, outro fator determinante na eficiência do processo CPE é a escolha da classe do surfactante. A classificação baseia-se na natureza do surfactante conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Classificação dos surfactantes (MANIASSO, 2001).

<i>Classificação</i>	<i>Exemplo de surfactante</i>
<i>Não-iônicos</i>	Polioxietileno (9-10) p-tercetil fenol (Triton X-100)
<i>Catiônicos</i>	Brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB)
<i>Aniônicos</i>	Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)
<i>Anfóteros</i>	4-(dodecildimetil amônio) butirato

Entre as classes de surfactantes, em específico aquelas que podem ser aplicadas na extração e pré-concentração de agrotóxicos, destaca-se os surfactantes não iônicos, os quais apresentam baixa toxicidade, sendo eficazes mesmo em baixas concentrações por apresentarem uma elevada solubilização (BODRATTI; ALEXANDRIDIS, 2018). Os surfactantes não iônicos mais utilizados são o Triton X-114 (TX-114) e o Triton X-100 (TX-100), ou uma combinação destes, apresentando solubilidade em solventes orgânicos, compostos polares e apolares, podendo ser aplicados na extração e pré-concentração de compostos catiônicos ou aniônicos (GLEMBIN et al., 2014; LÓPEZ-MAYÁN et al., 2018).

Um surfactante para ser empregado em CPE deve apresentar algumas características desejáveis, tais como baixa temperatura de ponto nuvem e alta densidade, que facilitam a separação das fases. Os surfactantes não-iônicos Triton X-100 e Triton X-114 apresentam essas características, além de ser facilmente disponíveis em um custo baixo. Em relação a quantificação, as técnicas comumente utilizadas são a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (ZHU et al, 2008; CHEN et al., 2009) e a cromatografia em fase gasosa com detecção fotométrica de chama (GC –FPD) (ZHAO et al., 2011).

A aplicação da CPE é relativamente simples: após obtenção da amostra aquosa contendo os analitos a serem extraídos, pré-concentrados e quantificados, alguns mililitros de uma solução concentrada de surfactante são adicionados a essa amostra. Em seguida, podem ser adicionados sais, álcoois, outros surfactantes, bem como algumas substâncias orgânicas ou inorgânicas que provoquem o aumento ou a diminuição da solubilidade da fase micelar em água. Sabe-se por exemplo, que a adição de certos eletrólitos aumenta ou diminui o ponto nuvem dos surfactantes, principalmente se tratando dos surfactantes não iônicos como o Triton X-114. Esses efeitos, conhecidos como “salting-in” e “salting-out” podem ser usados para estimular a indução do ponto nuvem (AOAC, 1995) em temperatura ambiente, podendo eliminar a etapa de aquecimento tornando o procedimento ainda mais simples.

Na última etapa a solução deve ser aquecida em banho termostático acima da temperatura de ponto nuvem para que ocorra a separação das fases. Nessa etapa observa-se a formação de duas fases, uma aquosa pobre em surfactante e a outra rica em surfactante, a qual representa um pequeno volume se comparado ao inicial. A etapa de separação de fases deve ser acelerada por centrifugação no caso de fases micelares de surfactantes que tenham densidade maior que a solução da amostra (COSTA, 2013). Após centrifugação, a fase rica

em surfactante contendo o analito é recolhida e diluída e o extrato encontra-se disponível para injeção no sistema de análise (MANIASSO, 2001).

Vários fatores podem interferir na extração dos analitos por CPE (força iônica do meio, concentração do surfactante e temperatura), sendo o pH um dos fatores mais importantes para uma eficiente extração, uma vez que exerce interferência na partição de moléculas orgânicas na fase micelar, principalmente daqueles que apresentam um grupo ácido ou básico na estrutura (XIE et al., 2010; PALEOLOGOS et al., 2005).

Quanto à aplicação do método de extração por ponto nuvem na extração de agrotóxicos observa-se o trabalho de Zuhair e Suher (2016), que desenvolveram um método de extração por ponto nuvem para a determinação do agrotóxico carbendazim em amostras de vegetais, laranja e água. Utilizou-se o surfactante não iônico de Triton X-114 obtendo-se limites de detecção de 0,46 e 0,49 ng mL⁻¹, fatores de enriquecimento de 85,7 e 38,9 vezes e recuperação entre 97,86 e 98,66 %.

Em outro trabalho foi utilizada a técnica CPE juntamente com o método de extração QuEChERS para extrair resíduos de quatro agrotóxicos da classe dos neonicotinóides de amostras de mel. O surfactante utilizado na etapa de extração foi o Triton X – 114 analisando as variáveis concentração de surfactante, concentração de eletrólito, concentração do agente de extração, tipo de solvente, temperatura e tempo de extração. A detecção foi realizada por UHPLC-MS/MS obtendo-se limites de detecção e quantificação de 0,13 a 0,18 µg kg⁻¹ e 0,2 a 2,3 µg kg⁻¹, respectivamente. As recuperações dos compostos de interesse estavam entre 85,3% a 104,5%, e excelente repetibilidade foi alcançada com desvios padrão relativos (DPR) variando de 2,0% a 11,5% (BAKAR; JAMIL; ABDULHUSSEIN, 2022).

Zhao et al. (2011), desenvolveram um novo método para a determinação de nove pesticidas organofosforados (diclorvos, metamidofós, acefato, diazinon, dimetoato, clorpirifós, metil paration, malation e etil paration) em suco de frutas concentrado utilizando extração por ponto nuvem e detecção por cromatografia gasosa com análise de detecção fotométrica de chama (GC-FPD). O surfactante escolhido foi o PEG 6000 obtendo-se fator de pré-concentração de 50 e limites de detecção e quantificação na faixa de 0,5–3,0 e 1,5–9,0 µg kg⁻¹, respectivamente.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Desenvolver procedimento analítico simples, rápido e confiável, para a extração e determinação dos agrotóxicos 2,4 D, atrazina, clorpirifós, deltametrina, diazinon, fipronil, malation e metil paration em amostras de milho e mel a partir da extração e pré-concentração por ponto nuvem (CPE).

2.2. ESPECÍFICO

- ❖ Desenvolver um método analítico baseado na extração e pré-concentração de agrotóxicos utilizando a metodologia de extração por ponto nuvem;
- ❖ Otimizar as variáveis do sistema cromatográfico (HPLC) para determinação e quantificação dos agrotóxicos de interesse;
- ❖ Validar a metodologia desenvolvida considerando o protocolo de validação de métodos de determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos proposto pela Comunidade Europeia – Documento SANTE/11813/2017 (SANTE, 2017);
- ❖ Comparar os resultados obtidos pelo método de extração por ponto nuvem com o método padrão QuEChERS;
- ❖ Aplicar o método desenvolvido em diferentes amostras de mel e milho.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. INSTRUMENTAÇÃO

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento da metodologia foram:

- Agitador vórtex, marca Kasvi, São Paulo;
- Balança analítica (Bioscale, São Paulo);
- Banho ultrassom, Ultra Cleaner 1400, Unique;
- Centrífuga, Celm;
- pHmetro digital (GEHAKA PG1800, São Paulo, Brasil);
- Coluna cromatográfica octadecil (C18) (250mm x 4,60 mm d.i., 5 µm);
- Micropipeta eletrônica, marca (Eppendorf);
- Sistema de purificação de água Ultrapure Water (Merck, Millipore);
- HPLC equipado com detector UV (SPD-20A, Shimadzu).

3.2. REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os solventes empregados no trabalho foram de grau HPLC e todos os reagentes foram de grau analítico. As soluções foram preparadas com água deionizada obtida pelo sistema de purificação (Milli-Q). Todas as vidrarias e frascos utilizados para realização dos experimentos foram previamente lavados e descontaminados em banho de HCl (Synth, Brasil) 10% v/v por 24 horas. Posteriormente, os materiais foram lavados várias vezes com água deionizada e secos à temperatura ambiente. Os solventes e água ultrapura foram filtrados individualmente em membranas de poli(tetrafluoretileno) (PTFE) de 0,45 μm de poros da Millipore.

As soluções de NaCl (99,8% m/m, Synth, Brasil), Triton X -100 (Sigma Aldrich) e Triton X- 114 (Sigma Aldrich) foram preparadas em balão de 100 mL utilizando água deionizada. Utilizou-se também metanol (99,9% v/v) da JTBaker (San Pedro Xalostoc, México), acetonitrila (99,9% v/v) da Tedia (Fairfield, EUA) e ácido acético da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Durante as análises de pH utilizou-se HCl e NaOH da Synth, Brasil.

Padrões analíticos de alta pureza, > 98%, dos princípios ativos 2,4 D, atrazina, clorpirifós, deltametrina, diazinon, fipronil, malation e metil paration foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Soluções padrão estoque de 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada agrotóxico foram preparadas em acetonitrila. Soluções padrão de trabalho em diferentes concentrações foram preparadas a partir da diluição da solução estoque para realização dos estudos de otimização e determinação das figuras de mérito.

3.3. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DE ANÁLISE

Inicialmente, testou-se diferentes misturas dos solventes de eluição em diferentes proporções. Os solventes analisados foram: acetonitrila, água, metanol e água acidificada com ácido acético a 1% (v/v). As proporções estudadas após escolha do melhor solvente de eluição foram: 40:60; 45:55; 50:50; 55:45; 60:40; 65:35; 70:30 (v/v).

Os parâmetros comprimento de onda e vazão de fase móvel também foram avaliados. O melhor comprimento de onda foi determinado através do estudo de cada agrotóxico na concentração de 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em espectrofotômetro UV-VIS, observando o comprimento que gerava uma banda de maior intensidade. Em relação a vazão de fase móvel testou-se os valores 0,8; 0,9; 1,0 e 1,2 mL min^{-1} . Todos os testes foram realizados com mistura dos agrotóxicos em concentração de 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada e a escolha das condições ideais foi feita

baseando-se em fatores como separação das bandas, resolução, alargamento das bandas dos compostos, tempo de análise, entre outros.

3.4. PREPARAÇÃO DAS MATRIZES DAS AMOSTRAS DE ALIMENTO EM ESTUDO

Os principais agrotóxicos utilizados por produtores rurais na região da cidade de Catalão-GO são o 2,4 D, atrazina, clorpirifos, deltametrina, diazinon, fipronil, malation e metil paration, sendo utilizados em culturas de milho, soja, tomate, feijão, batata, entre outras.

Afim de obter os extratos para aplicação em estudos de otimização e validação, 5,0 g de amostras de mel e milho triturado foram pesadas e transferidas para tubos cônicos do tipo Falcon de 50,0 mL sendo fortificadas com os agrotóxicos em estudo obtendo concentração nominal de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada um após extração. As amostras foram deixadas em repouso por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 5,0 mL do solvente $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (25:75) e os tubos foram submetidos à agitação por vórtex em diferentes tempos de contato (1 e 3 min). Posteriormente, os tubos foram levados a centrífuga por 10 min a uma velocidade de rotação de 9000 rpm. O sobrenadante foi removido e aplicou-se o procedimento de extração por ponto nuvem (CPE).

Após otimização das variáveis de extração validou-se o método proposto considerando dois documentos que tratam sobre análise de agrotóxicos em alimentos. O documento de orientação da Comunidade Europeia que trata do controle de qualidade analítico e procedimentos de validação de metodologias para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (SANTE/11813/2017) e o Manual de Garantia da Qualidade Analítica para Resíduos e Contaminantes em Alimentos elaborado pelo MAPA (MAPA, 2011).

3.5. EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM

3.5.1. INFLUÊNCIA DO pH NA ETAPA DE EXTRAÇÃO

A influência do pH na extração dos analitos foi estudada na faixa entre 1,0 e 12,0 e o resultado foi verificado considerando-se a magnitude da área cromatográfica de cada agrotóxico em HPLC-UV. Para adequação do pH foi empregada soluções diluídas de HCl ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) e NaOH ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$). Nessa etapa, 5,0 mL do extrato de cada amostra

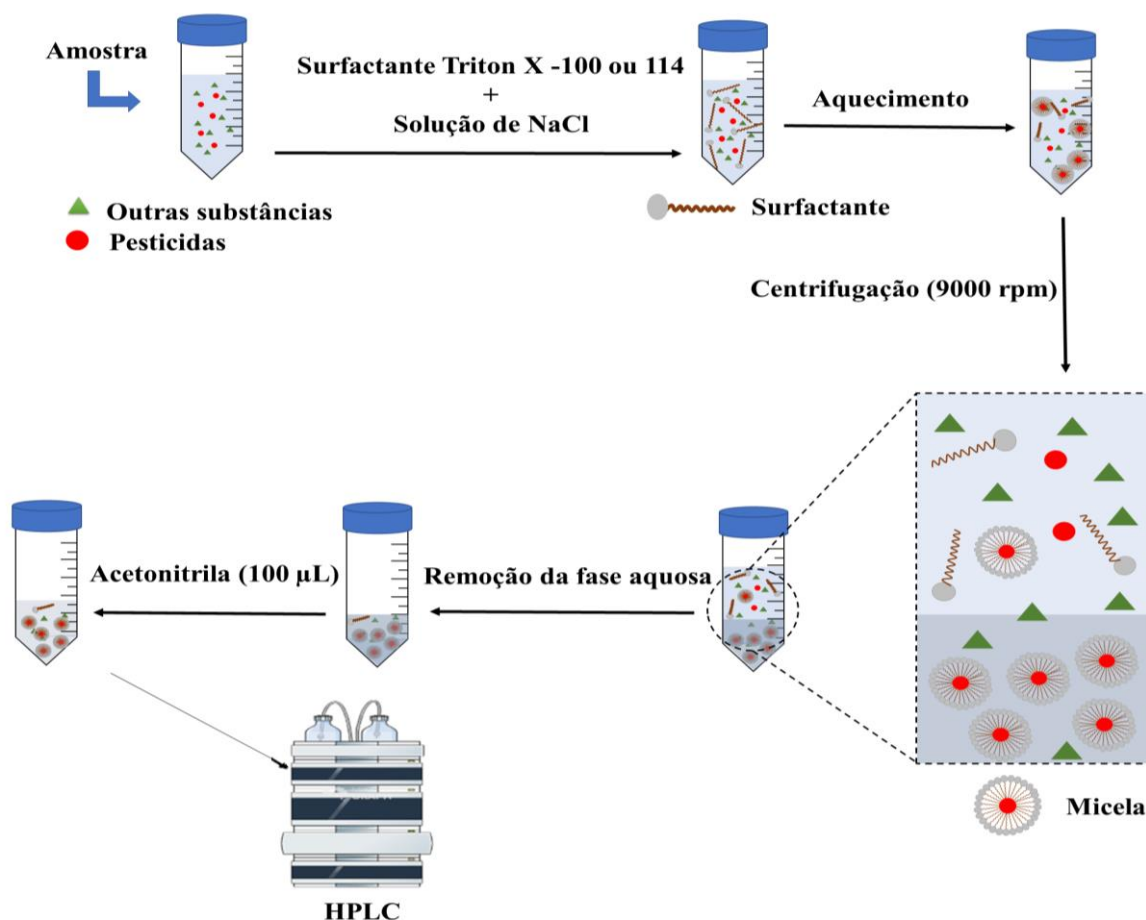
(obtidos conforme procedimento descrito na seção 3.4) foram devidamente acertados com soluções de HCl e NaOH até obtenção do pH desejado. As soluções foram enriquecidas com solução padrão dos agrotóxicos obtendo concentração nominal final igual a $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para cada agrotóxico.

O procedimento de extração por Ponto Nuvem foi aplicado sobre os extratos obtidos (seção “*Seleção das variáveis utilizadas no método CPE*”) utilizando 2,0 mL de surfactante TX-100 (1,5% m/v) e 1,0 mL de solução do eletrólito NaCl 2,0% m/v, ajustando o volume final para 10,0 mL com água deionizada. Após extração as soluções foram diluídas com 100 μL de acetonitrila e injetadas em sistema HPLC-UV em condições previamente otimizadas.

3.5.2. SELEÇÃO DAS VARIÁVEIS UTILIZADAS NO MÉTODO CPE

O método escolhido para extração dos resíduos de agrotóxicos nas amostras de alimento em estudo foi a Extração por Ponto Nuvem (Figura 1).

Figura 1: Etapas de extração dos agrotóxicos por ponto nuvem. Fonte: (Autor).



A otimização ocorreu por análise univariada e dois surfactantes foram escolhidos para realização das etapas de extração e pré-concentração por ponto nuvem (Triton X- 100 e Triton X -114). As variáveis estudadas e suas condições de estudos são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Variáveis estudadas na otimização do método CPE.

<i>Variável</i>	<i>Condição de estudo</i>
<i>Concentração de surfactante (% m/v)</i>	0,5 – 5,0
<i>Concentração de NaCl (% m/v)</i>	1,0 – 5,0
<i>Tempo de aquecimento (min)</i>	5 – 45

Após obtenção dos extratos de cada matriz (seção 3.4) e posterior correção do pH iniciou-se a otimização das variáveis de extração considerando as condições de análise. Nessa etapa 2,0 mL da solução de surfactante (TX- 100 ou TX-114) e 1,0 mL do eletrólito (NaCl), foram adicionados ao extrato realizando leve agitação em vórtex. O tubo contendo a solução foi levado para aquecimento a 40°C com TX-114 e 80°C com TX-100 em tempo determinado e, posteriormente, realizou-se a centrifugação a 9000 rpm pelo tempo de 5,0 minutos. Após essa etapa, a fase aquosa foi removida e a fase rica em surfactante (aproximadamente, 300 µL) foi diluída com 100 µL de acetonitrila e armazenada na temperatura de 4 °C para posterior análise em HPLC/UV.

3.5.3. CURVA DE CALIBRAÇÃO COM E SEM CPE: FATOR DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO

A técnica de extração por Ponto Nuvem tem como principal função extrair e pré-concentrar o analito de interesse presente na amostra em estudo. Assim, para dimensionar o nível de pré-concentração de cada composto, utilizou-se o fator de pré-concentração (FC), que é obtido a partir da construção de duas curvas analíticas (com e sem procedimento de extração).

Para a obtenção da curva de calibração sem qualquer processo de extração, injeções da mistura dos padrões dos agrotóxicos preparados em solvente acetonitrila nas seguintes faixas de concentração de 0,08 a 2,5 µg mL⁻¹ para os agrotóxicos clorpirifós, diazinon, malation, atrazina, 2,4 D e deltametrina e de 0,1 a 2,5 µg mL⁻¹ para o fipronil e metil paration. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e cada ponto da curva foi obtido pela média aritmética das áreas determinadas em sistema HPLC-UV.

Para a determinação do fator de pré-concentração (F_c) construiu-se uma curva de calibração utilizando o procedimento otimizado CPE. As extrações de cada ponto da curva foram realizadas em triplicata e após injeção em sistema HPLC-UV foi obtido a média aritmética das áreas de cada injeção.

Após obtenção dos dados aplicou-se a razão entre os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas com e sem o procedimento de extração para obtenção do fator de pré-concentração de acordo com a Equação 1 (ESCALEIRA, 2005; COSTA, 2013).

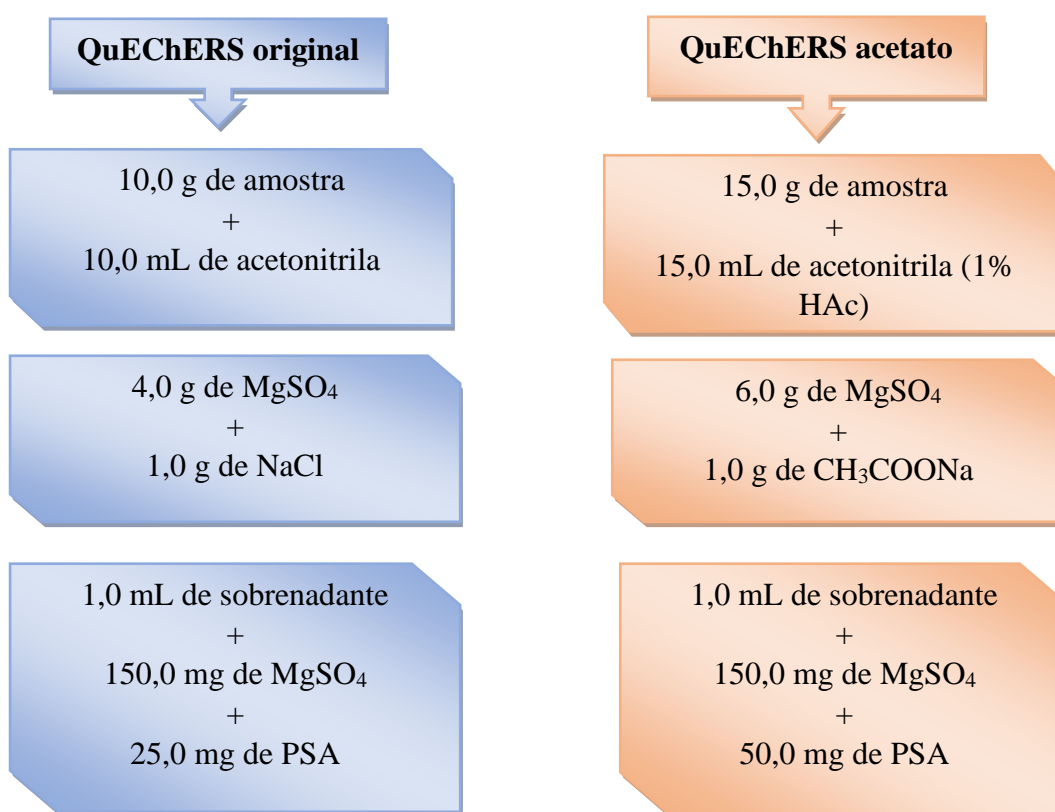
$$F_c = \frac{x_1}{x_2} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que, F_c é o fator de pré-concentração, x_1 é o coeficiente angular da curva analítica obtida com procedimento de extração e x_2 é o coeficiente angular da curva analítica sem extração.

3.5.4. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS EMPREGANDO O MÉTODO QUECHERS PADRÃO E MODIFICADO (QUECHERS ACETATO)

Afim de comparar o método proposto (CPE) com o método oficial QuEChERS utilizado por laboratórios acreditados e Comitês Internacionais de Normalização (Comissão Europeia) para quantificação de agrotóxicos em alimento, empregou-se a técnica QuEChERS original e QuEChERS acetato (modificado) para as mesmas amostras avaliadas pelo método CPE. A Figura 2 apresenta um fluxograma que estuda as etapas de execução do método QuEChERS (original e acetato).

Figura 2: Etapas utilizadas nas análises pelo método QuEChERS original e acetato.



O preparo de amostras envolvendo o método de extração QuEChERS consistiu em pesar em dois tubos cônico do tipo Falcon (volume de 50,0 mL) determinada massa de amostra fortificada com os agrotóxicos de interesse na concentração de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ seguida da adição do solvente acetonitrila em cada tubo, sendo agitados em vortex por 1 minuto e adicionado em seguida o MgSO_4 em ambos. No tubo utilizado para o QuEChERS original acrescentou-se NaCl e no tubo do QuEChERS acetato foi adicionado CH_3COONa . Agitou-se a mistura em vórtex por 1 minuto, seguido de centrifugação a 9000 rpm por 5 minutos. Retirou-se 1,0 mL do sobrenadante de cada tubo realizando o clean-up final da matriz com MgSO_4 e PSA. As soluções foram injetadas em HPLC/UV, obtendo a área de cada composto para posterior quantificação.

Durante os estudos de exatidão (recuperação) e precisão, as amostras analisadas pelo método QuEChERS foram fortificadas em três níveis de concentração (0,1; 0,5 e $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e todo o procedimento foi realizado em 6 (seis) replicatas para cada nível de concentração avaliado.

3.5.6. FIGURAS DE MÉRITO AVALIADAS

Atualmente os guias internacionais mais utilizados e citados para validação de métodos cromatográficos na análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos são o SANTE/11813/2017 (SANTE, 2017) e a Decisão 2002/657/CE (COMMISSION DECISION, 2002), ambos elaborados pela Comunidade Europeia. No Brasil outros guias de validação para métodos analíticos são utilizados, destacando-se o DOQ-CGCRE- 008 – Rev. 07 – Jul/18 (DOQ-CGCRE, 2018) elaborado pelo INMETRO, a RDC N° 166, de 24 de Julho de 2017 desenvolvida pela ANVISA (RDC, 2017) e o Manual de Garantia da Qualidade Analítica para Resíduos e Contaminantes em Alimentos elaborado pelo MAPA (MAPA, 2011).

O método proposto neste trabalho (CPE-HPLC/UV) foi validado considerando dois guias, o protocolo proposto pela Comunidade Europeia – documento SANTE/11813/2017 (SANTE, 2017), uma vez que é o mais empregado e reconhecido entre aqueles que fazem referência a metodologias analíticas para determinação de resíduos de agrotóxicos, e o Manual de Garantia da Qualidade Analítica para Resíduos e Contaminantes em Alimentos elaborado pelo MAPA (MAPA, 2011), que é o guia nacional específico para as análises pretendidas.

As figuras de mérito avaliadas neste trabalho foram: limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), seletividade/especificidade, linearidade, exatidão (ensaios de

recuperação) e a precisão (inter-dia).

Determinou-se o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) dos agrotóxicos considerando a etapa de extração por ponto nuvem e as soluções dos analitos apenas em solvente (sem extração). O limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foi determinado experimentalmente através da análise de amostras fortificadas com os agrotóxicos em concentrações decrescentes, após terem sido extraídas pelo procedimento CPE otimizado. As soluções obtidas foram analisadas em sistema HPLC/UV e os valores de LD e LQ foram obtidos pela relação razão sinal/ruído maior ou igual a 3 para o LD e maior ou igual a 10 para o LQ. Considerou-se um desvio padrão inferior a 20% e reprodutibilidade maior ou igual a 75% (MAPA, 2011; SANTE, 2017). Todas as soluções foram preparadas em triplicata.

A fim de verificar se os componentes presentes na matriz e os surfactantes utilizados poderiam atuar como interferentes durante as análises avaliou-se a seletividade do método (SANTE, 2017): (1) obteve-se a matriz de cada alimento, aplicando em seguida o método CPE otimizado a fim de avaliar possíveis interferentes advindos do método e que estivessem no mesmo tempo de retenção de cada agrotóxico em estudo; (2) análise da matriz de cada alimento sem aplicação do método CPE. Comparou-se os cromatogramas nas situações indicadas 1 e 2 observando possíveis interferentes gerados tanto pela matriz quanto pelos reagentes utilizados no método proposto. De acordo com os critérios destacados no guia do MAPA (MAPA, 2011), o sinal do interferente deve ser $\leq 30\%$ do sinal na concentração do Menor Nível Calibrado.

A linearidade do método de extração por ponto nuvem foi avaliada pela superposição de matriz (“matrix-matched”) a partir da injeção em quintuplicata de soluções padrões dos agrotóxicos preparadas em solvente (acetonitrila) e pela fortificação das amostras branco com os agrotóxicos em sete níveis de concentração com posterior extração por ponto nuvem e análise por HPLC/UV. A partir da área obtida para de cada analito, nos diferentes níveis de concentração, foram construídas curvas analíticas. Determinou-se o coeficiente de determinação (R^2) e a linearidade foi considerada aceitável quando o R^2 obtido foi maior que 0,99 (SANTE, 2017).

A exatidão do método foi determinada a partir de resultados de recuperação. Nessa etapa as matrizes extraídas foram fortificadas com os agrotóxicos em 3 (três) diferentes níveis de concentração (0,03; 0,5 e 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e, posteriormente, seguiu-se o processo de extração por CPE. Todo o procedimento foi realizado em 6 (seis) replicatas para cada nível de concentração avaliado. A recuperação foi calculada segundo a Equação 2.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(\text{concentração do analito extraído})}{(\text{concentração do analito adicionado})} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

O método foi considerado exato quando a recuperação obtida ficou na faixa de 70 a 120 % da concentração inicial com uma precisão menor que 20% (MAPA, 2011; SANTE, 2017).

A precisão intermediária foi avaliada através de análises inter-dia (extração dos resíduos de agrotóxicos em 3 dias distintos). O método é considerado reprodutível quando o coeficiente de variação para os extratos for inferior a 20% (SANTE, 2017). Para cada concentração foram realizados 6 ensaios. Os resultados obtidos nos ensaios de precisão intermediária (inter-dia) foram avaliados por meio do teste de significância, utilizando o teste de Student mostrado na Equação 3 (OLIVEIRA, 2012).

$$t = [(R\%_m - 100) / DP_{rec}] / n^{1/2} \quad (\text{Equação 3})$$

onde, t é o valor do teste de Student, $R\%_m$ é a porcentagem de recuperação média obtida para n repetições, 100 é a recuperação percentual desejada, n é o número de determinações e DP_{rec} é o desvio padrão das recuperações. Se o valor obtido de t for menor ou igual ao valor tabelado ($t_{crítico}$), para $(n - 1)$ graus de liberdade em um dado nível de significância (0,05), o método é considerado exato, ou seja, não há diferenças significativas entre a porcentagem de recuperação obtida e o valor desejável (100%).

A avaliação do efeito de matriz (EM), foi realizada conforme o documento SANTE/11813/2017 (SANTE, 2017) e o guia do MAPA (MAPA, 2011) que recomenda a construção de curvas analíticas preparadas em solvente e nos extratos da matriz de cada alimento obtidos após aplicação do método CPE. Injetou-se em sistema HPLC as soluções obtidas e a área de cada analito foi registrada para a construção das curvas analíticas. A avaliação do efeito de matriz foi realizada por comparação das inclinações das curvas analíticas preparadas em solvente e nos extratos de cada alimento utilizando a Equação 4.

$$\text{Efeito de matriz (\%)} = \frac{(x_1 - x_2)}{x_2} \cdot 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Onde: x_1 = inclinação da curva analítica preparada na matriz de cada alimento para cada agrotóxico; x_2 = inclinação da curva analítica preparada em solvente para cada agrotóxico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

A otimização das condições cromatográficas é essencial para gerar confiabilidade nos resultados obtidos facilitando a etapa de identificação e quantificação dos analitos de interesse. Neste sentido a primeira etapa realizada foi a otimização das condições cromatográficas de análise (vazão dos solventes, comprimento de onda, solventes da fase móvel, proporção dos solventes de eluição, volume de injeção).

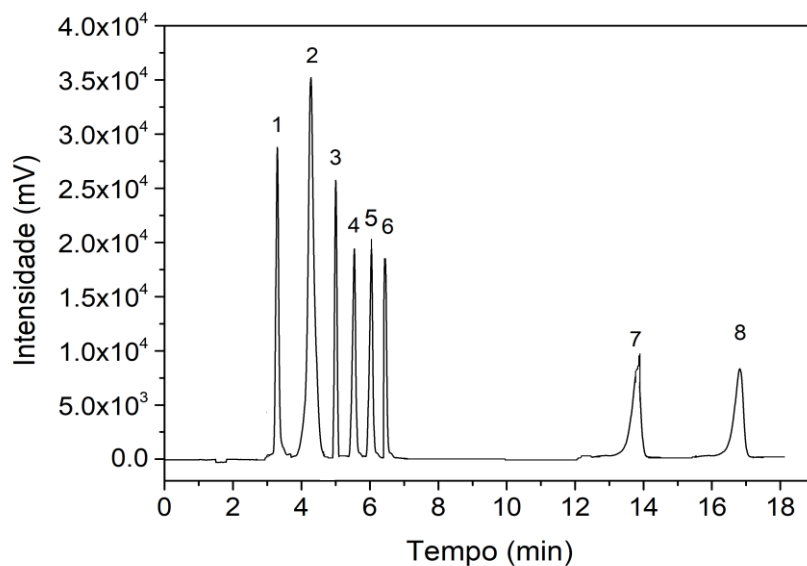
Após avaliação das variáveis supracitadas verificou-se que a mistura ACN/H₂O foi a que melhor se adequava para separar os analitos em estudo, minimizando efeitos como alargamento de banda ou coeluição dos compostos. Além disso, ao testar as diferentes proporções da mistura ACN/H₂O, foi observada uma boa separação para os compostos de interesse e um menor tempo de análise quando se utiliza a proporção 60:40 v/v ACN/H₂O. As condições cromatográficas otimizadas são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Condições cromatográficas otimizadas em HPLC/UV.

<i>CARACTERÍSTICA</i>	<i>DESCRIÇÃO DAS CONDIÇÕES</i>
Fase Móvel	ACN/H ₂ O
Proporção da fase móvel (v/v)	60:40
Coluna Cromatográfica	ODS (4,6 x 250 mm, 5 µm)
Comprimento de onda para detecção (nm)	210 e 226
Vazão (mL min ⁻¹)	1,0
Temperatura do forno (°C)	28
Volume de injeção (µL)	20
Solução de limpeza da seringa de injeção	ACN (100 %)
Tipo de eluição	Isocrática

Após definição e otimização dos parâmetros no sistema HPLC-UV foi preparada uma solução analítica na concentração de 1,0 µg mL⁻¹ contendo a mistura dos agrotóxicos em estudo em solvente acetonitrila, e a solução foi injetada no HPLC-UV nas condições otimizadas (Figura 3).

Figura 3: Cromatograma dos padrões dos agrotóxicos em solvente acetonitrila nas condições otimizadas em HPLC/UV: 1- 2,4D; 2- atrazina; 3- metil paration; 4- malation; 5- fipronil; 6- diazinon; 7- deltametrina; 8- clorpirifós.



Os tempos de retenção para cada agrotóxico estudado neste capítulo são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Tempo de retenção (t_R) para os agrotóxicos em estudo.

Analito	t_R (min)
2,4D	3,0
Atrazina	3,9
Metil paration	4,8
Malation	5,4
Fipronil	5,8
Diazinon	6,3
Deltametrina	13,2
Clorpirifós	16,2

Como pode ser observado na Figura 3 e Tabela 5, os picos dos agrotóxicos apresentaram boa separação e resolução confirmando a otimização dos parâmetros no sistema HPLC-UV.

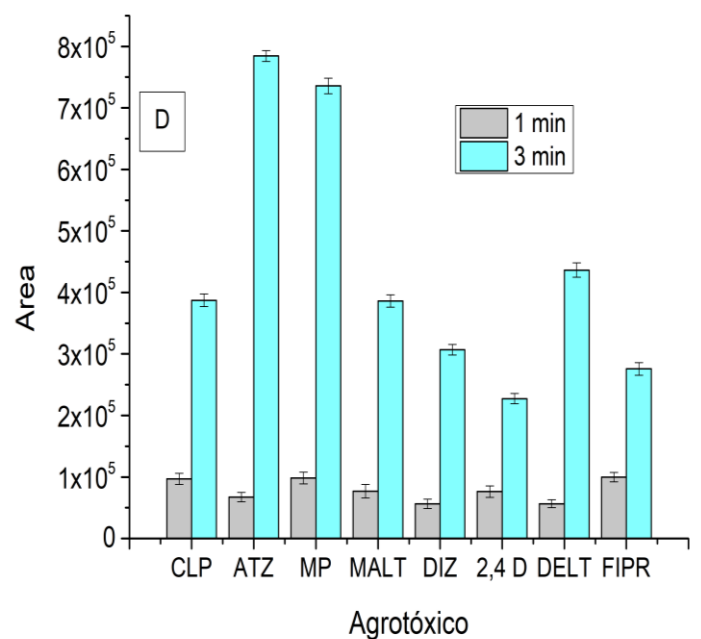
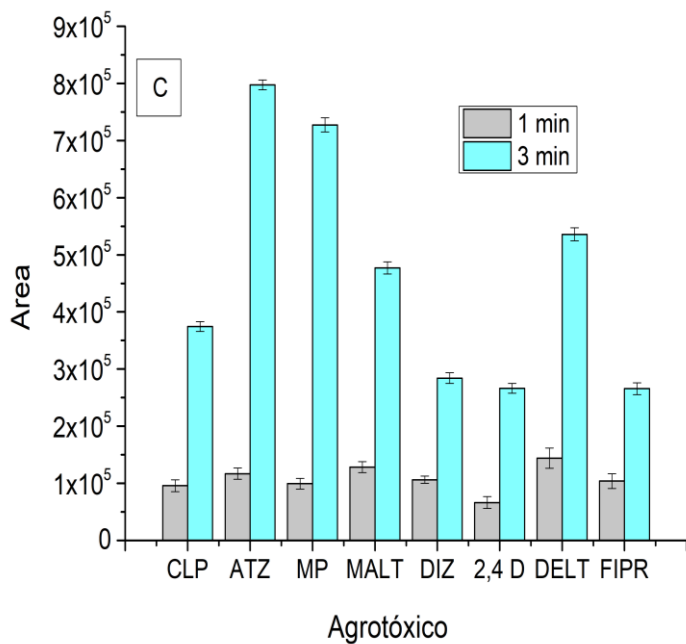
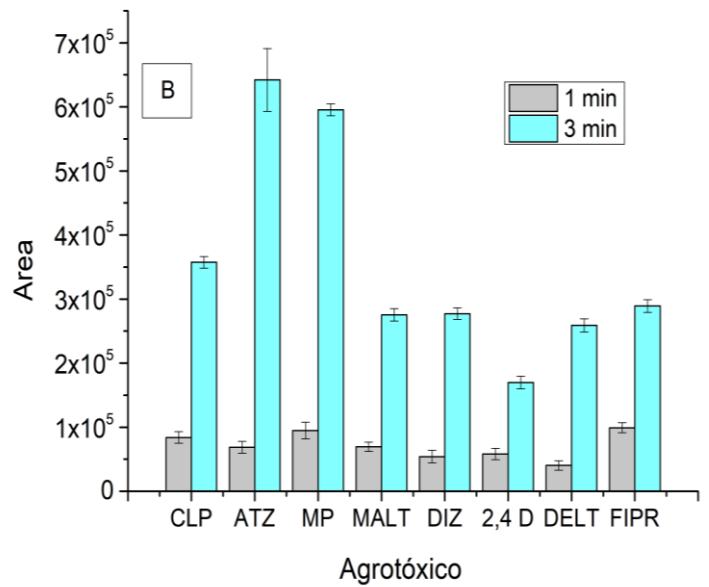
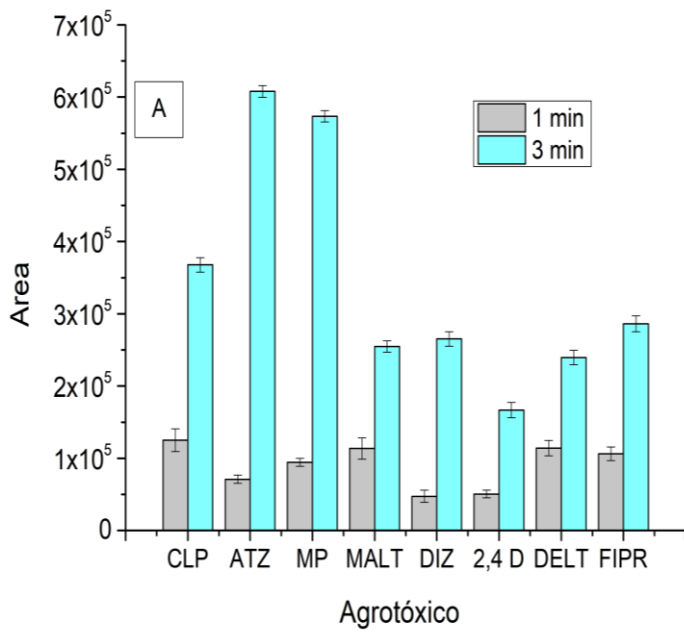
4.2. PREPARAÇÃO DAS MATRIZES DAS AMOSTRAS DE ALIMENTO EM ESTUDO

Para que a extração por ponto nuvem (CPE) fosse realizada era necessário que a amostra ou matriz extraída da amostra esteja em condições adequadas para aplicação do método. A CPE tem como característica a extração dos analitos de interesse para uma fase rica em surfactante, sendo a fase aquosa descartada. A maioria dos surfactantes apresentam a fase rica na parte inferior do frasco de extração, dificultando o uso direto da amostra na etapa de CPE. Alguns surfactantes, pelo contrário, como os da família do Tergitol, apresentam a fase rica na parte superior do frasco de extração, fato que facilitaria o uso da amostra de forma direta.

Os surfactantes utilizados nesse capítulo (TX 100 e TX 114) apresentam a fase rica em surfactante na parte inferior do frasco necessitando, então, que se obtenha inicialmente a matriz extraída da amostra para posterior aplicação da extração por ponto nuvem.

Para obter as matrizes dos alimentos em estudo as amostras em análise foram colocadas em contato com solvente extrator (ACN/H₂O) e testou-se diferentes tempos de extração (Figura 4).

Figura 4. Estudo do tempo de agitação para obtenção da matriz de cada alimento: matriz milho com TX-100 (A) e TX-114 (B); matriz mel com TX-100 (C) e TX-114 (D). CLP: clorpirifós; DELT: deltametrina; MP: metil paration; MALT: malation; DIZ: diazinon; ATZ: atrazina; FIPR: fipronil.



Nota-se nos gráficos da Figura 4 que no tempo de contato de 1 minuto a área obtida para cada agrotóxico nas diferentes matrizes é pequena se comparada as áreas obtidas em 3 minutos. Maiores valores de área indicam melhor eficiência de extração, portanto, optou-se pelo tempo de contato de 3 minutos para a extração dos agrotóxicos em estudo.

É importante salientar que além do tempo de contato, outro fator de extrema importância no processo de extração é a escolha do solvente extrator. Neste capítulo optou-se

pela mistura água/acetonitrila que auxiliou na extração dos agrotóxicos que apresentam diferentes valores de coeficiente de partição octanol/água - log Kow (clorpirifós – 4,96; 2,4 D – 2,58; atrazina – 2,61; malation – 2,36; diazinon – 3,81; metil paration – 3,01; deltametrina – 6,20; fipronil – 4,0) (PUBCHEM, 2021; BARCELÓ, HENNION, 1997) facilitando, conjuntamente com um tempo de extração adequado, uma melhor interação solvente/analito e conseqüentemente, melhores resultados de recuperação.

4.3. INFLUÊNCIA DA VARIÁVEL pH NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO

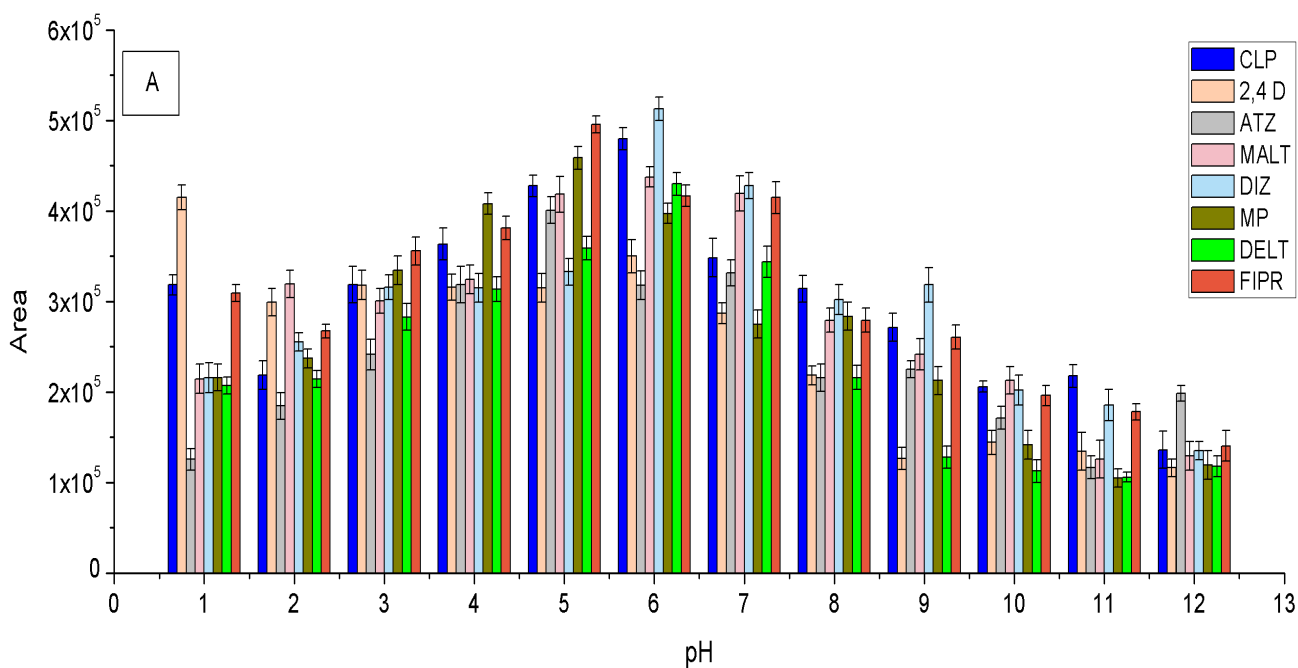
Considerando que o pH exerce influência na eficiência de extração dos agrotóxicos pela técnica de ponto nuvem, sendo considerado variável principal, realizou-se, então, um estudo univariado para verificar a influência do pH no processo de extração. A faixa estudada variou de 1 a 12. A Figura 5 apresenta os resultados obtidos durante o estudo de pH para a matriz de milho e mel utilizando o TX 100 e TX 114.

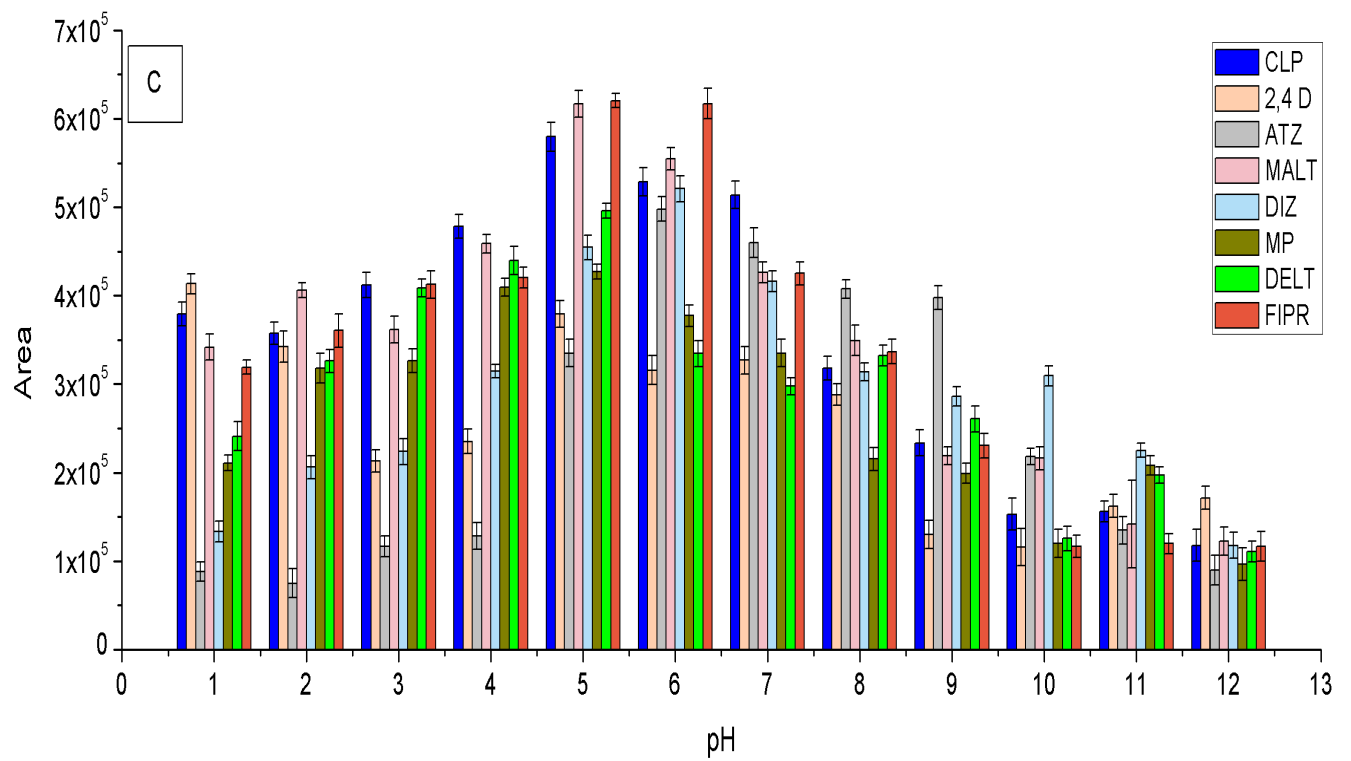
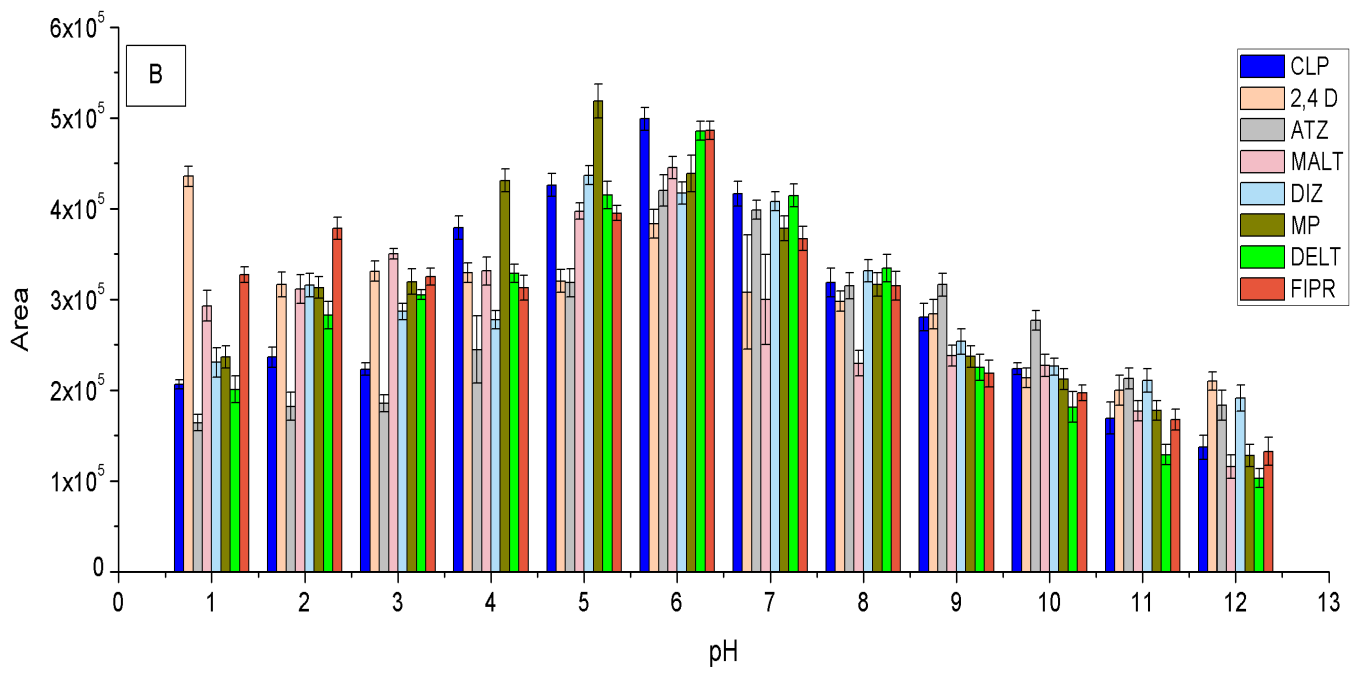
Os resultados obtidos (Figuras 5) não apontam para uma linearidade de extração entre os analitos em estudo. Tal situação se deve a diversos fatores, destacando a competitividade entre as moléculas de interesse e entre compostos presentes no extrato da matriz durante a formação das micelas. Outro fator a ser considerado em processos de CPE é a forma molecular do analito. FERRERA et al. (2004), demonstrou que, quando o analito de interesse se encontra em sua forma neutra, ocorre maior afinidade com agregados micelares de surfactantes não iônicos (TX-100 e TX-114). Neste contexto, observa-se a necessidade de estudar o comportamento iônico das moléculas de agrotóxicos em função do pH do meio em que se encontram.

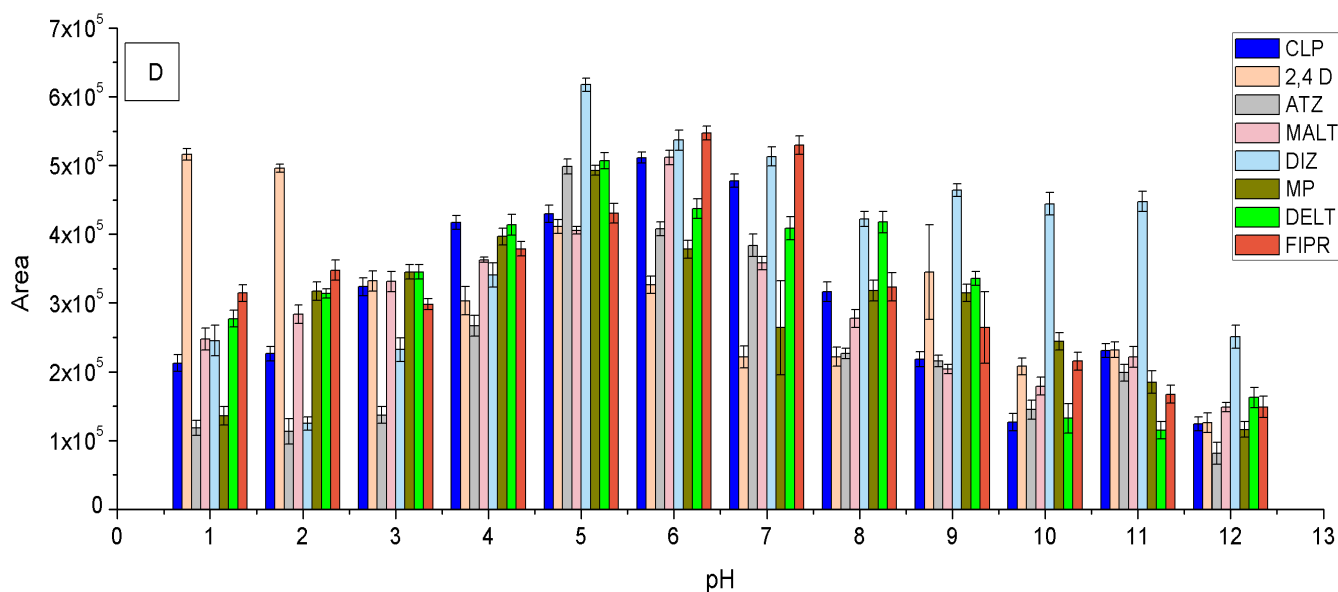
Os compostos clorpirifós, malation, metil paration e fipronil não apresentam variação de estrutura em função do pH. O agrotóxico 2,4 D encontra-se em estado ionizado acima de pH 3,0, enquanto a atrazina e o diazinon apresentam-se em sua forma neutra acima de pH 4,5. A deltametrina, por sua vez, apresenta comportamento iônico apenas em pH acima de 9,0. Maiores eficiências de extração por CPE utilizando TX 100 e TX 114 deveriam ser, de fato, esperadas, quando o pH das amostras em estudo estivessem em um intervalo no qual as moléculas se apresentassem na forma neutra, fato observado nos resultados em que as matrizes apresentaram pH entre 5,0 e 6,0. Neste intervalo de pH a maioria das moléculas em estudo encontram-se em estado neutro, com exceção do 2,4 D que estará ionizado, uma vez que o valor de pH ideal para esse analito destoa-se da faixa ideal para os outros sete

compostos, minimizando a extração do 2,4 D em relação aos demais agrotóxicos. Contudo, este fator não impossibilitou a eficiência de extração e quantificação do mesmo.

Figura 5. Estudo da influência da variação do pH na etapa de extração: matriz milho com TX-100 (A) e TX-114 (B); matriz mel com TX-100 (C) e TX-114 (D). CLP: clorpirifós; DELT: deltametrina; MP: metil paration; MALT: malation; DIZ: diazinon; ATZ: atrazina; FIPR: fipronil.







Outra característica observada na Figura 5 é que a maioria dos agrotóxicos apresentam os melhores resultados de extração quando as matrizes encontram-se em pH ácido ao neutro, ocorrendo uma diminuição em soluções com caráter básico. Esse fenômeno pode estar relacionado a tendência que os agrotóxicos possuem, principalmente os organofosforados e organoclorados, em sofrerem reações de hidrólise interferindo na interação do analito com os surfactantes em estudo. Os piretróides como a deltametrina, por exemplo, tendem a ser mais estáveis em meio ácido e neutro, diferente das triazinas como a atrazina, por exemplo, que se tornam mais estáveis em valores de pH acima de 5,0 (LASKOWSKI, 2002).

O pH da solução não possui efeito significativo sobre as moléculas de surfactantes não-iônicos. Logo a variação da eficiência de extração dos agrotóxicos em estudo está relacionada a variação do estado iônico das moléculas a serem extraídas e sua interação com as moléculas de surfactante. Assim, acredita-se que o efeito do pH sobre as amostras analisadas representem um balanço entre a eficiência do mecanismo de formação de micelas em diferentes pH e a afinidade dos analitos por elas. Portanto, o valor de pH selecionado para estudos posteriores utilizando a matriz de mel foi 5,0 e para a matriz de milho foi 6,0.

4.4. OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM

4.4.1 CONCENTRAÇÃO DE SURFACTANTE (TX-100 E TX-114)

A concentração de surfactante utilizado no procedimento CPE é fundamental para garantir a extração e a reprodutibilidade dos resultados. A formação dos agregados micelares se inicia a partir da concentração micelar crítica (CMC), ocasionando uma mudança brusca nas propriedades físicas e químicas da solução (SANTOS, 2014). O estudo da concentração do surfactante é necessário, porque esta precisa estar acima da CMC e em quantidade suficiente para extração do composto de interesse.

É necessário salientar que se o surfactante estiver em altas concentrações pode haver um decréscimo do sinal analítico devido ao aumento do volume da fase rica ocorrendo, conseqüentemente, uma diluição do analito no surfactante. Por outro lado, se a concentração do surfactante for muito baixa a quantidade de micelas formadas podem ser insuficientes para extração quantitativa do analito o que acarreta em uma baixa eficiência de pré-concentração (REZENDE, 2010).

As Tabelas 6 e 7 mostram os resultados obtidos durante o estudo da influência da concentração dos surfactantes TX 100 e TX 114 na extração dos analitos de interesse nas matrizes de mel e milho.

Tabela 6: Estudo da influência da concentração do surfactante na etapa de extração: matriz mel com TX-100 e TX-114.

TX 114 – MEL												
Compostos	Área 0,5% m/v	DPR (%)	Área 1,0% m/v	DPR (%)	Área 2,0% m/v	DPR (%)	Área 3,0% m/v	DPR (%)	Área 4,0% m/v	DPR (%)	Área 5,0% m/v	DPR (%)
Clorpirifós	71691,67	15,38	206943,33	4,09	423535,01	3,58	377285,67	3,21	317763,02	5,36	257708,66	5,44
2,4 D	78396,67	16,29	137366,33	8,27	335585,00	3,44	297870,62	2,72	231541,36	6,42	207406,27	5,58
Atrazina	107368,08	9,10	221242,33	8,06	401252,23	3,89	294736,18	3,43	204025,66	4,18	128656,18	6,08
Malation	96582,01	12,73	216119,34	6,44	408289,96	2,85	319640,32	4,19	228563,18	4,15	198145,26	6,77
Diazinon	117225,33	10,25	219718,00	4,50	326847,21	2,15	417813,20	4,23	315799,35	4,46	255308,17	5,43
Metil paration	85425,56	8,79	167859,03	12,30	358819,67	2,81	282584,32	5,13	205306,11	5,71	134791,45	10,94
Deltametrina	110738,66	15,39	202598,64	7,80	407159,21	2,86	316132,87	4,18	184718,56	5,82	125871,36	8,63
Fipronil	111152,00	15,64	167360,33	7,45	401693,85	5,10	271336,08	4,35	313118,64	4,01	241856,34	6,81
TX 100 – MEL												
Compostos	Área 0,5% m/v	DPR (%)	Área 1,0% m/v	DPR (%)	Área 2,0% m/v	DPR (%)	Área 3,0% m/v	DPR (%)	Área 4,0% m/v	DPR (%)	Área 5,0% m/v	DPR (%)
Clorpirifós	110863,32	14,38	173706,21	10,17	318476,28	4,15	413917,06	3,14	315842,39	4,09	266585,24	4,96
2,4 D	80049,25	15,66	204701,64	8,18	308056,12	3,65	338293,18	3,15	256785,67	5,18	215159,08	6,55
Atrazina	111456,89	7,94	212137,76	6,16	317605,33	4,38	398267,55	2,81	299530,32	5,34	214920,42	6,77
Malation	106299,32	12,01	231072,94	4,22	309162,54	3,22	356814,66	3,30	274832,33	3,93	186991,75	6,69
Diazinon	114983,26	10,56	181864,36	9,49	250473,26	5,94	376704,13	5,04	285820,64	6,20	207240,56	5,71
Metil paration	85443,21	11,62	202947,67	8,67	278558,33	3,71	414853,21	2,15	318374,41	4,45	278,862,14	5,13
Deltametrina	109116,32	10,39	186160,23	4,57	285712,22	3,63	428737,33	3,23	326256,84	2,25	230563,11	7,66
Fipronil	118967,00	11,90	226133,34	5,56	277708,15	4,18	408873,21	2,49	300708,32	6,06	197111,56	6,10

Tabela 7: Estudo da influência da concentração do surfactante na etapa de extração: matriz milho com TX-100 e TX-114.

TX 114 – MILHO												
Compostos	Área 0,5% m/v	DPR (%)	Área 1,0% m/v	DPR (%)	Área 2,0% m/v	DPR (%)	Área 3,0% m/v	DPR (%)	Área 4,0% m/v	DPR (%)	Área 5,0% m/v	DPR (%)
Clorpirifós	99047,32	14,14	197322,71	3,92	341498,26	4,42	417232,56	3,46	319873,14	3,61	273846,17	6,30
2,4 D	62191,33	16,88	179620,03	8,47	322500,18	3,06	306915,42	4,07	164333,09	8,73	134546,62	9,11
Atrazina	80166,23	17,81	196171,24	5,22	397463,18	2,17	312226,87	4,77	215325,31	6,31	177952,64	4,97
Malation	107888,22	10,39	211643,05	6,91	415996,30	4,50	314986,88	3,01	367338,31	2,73	305471,16	4,51
Diazinon	77672,67	16,84	157313,20	6,01	406195,29	2,65	239985,54	7,21	216323,74	5,55	157392,25	9,36
Metil paration	86060,96	10,19	207064,02	4,22	414747,64	3,27	327423,66	3,52	342850,74	15,6	135602,41	7,84
Deltametrina	75431,98	11,88	154315,22	9,01	409767,42	3,24	299580,65	4,28	325108,26	4,56	235507,19	6,57
Fipronil	95326,02	15,20	160091,72	8,26	405793,64	4,63	315825,07	2,79	257110,33	3,71	196731,48	6,33
TX 100 – MILHO												
Compostos	Área 0,5% m/v	DPR (%)	Área 1,0% m/v	DPR (%)	Área 2,0% m/v	DPR (%)	Área 3,0% m/v	DPR (%)	Área 4,0% m/v	DPR (%)	Área 5,0% m/v	DPR (%)
Clorpirifós	85869,67	15,23	146970,23	7,75	286527,31	3,30	437303,12	4,86	414977,14	3,40	318441,02	5,18
2,4 D	92341,26	8,16	219614,85	6,56	295873,23	6,42	327197,01	3,73	299609,47	5,32	195677,82	5,91
Atrazina	106722,56	9,43	140403,29	9,55	306071,55	4,23	363790,26	4,10	318528,21	4,18	226517,41	5,14
Malation	102533,33	11,09	202493,44	7,87	326509,62	4,71	377307,18	5,77	245406,24	6,01	162989,36	10,25
Diazinon	122844,64	11,58	219840,47	6,18	314759,66	4,26	408740,78	1,73	326894,32	3,40	217799,61	3,77
Metil paration	98632,33	16,22	232682,21	6,34	408956,06	2,44	342823,10	3,11	308215,55	3,33	212193,64	8,01
Deltametrina	82293,13	16,13	211189,25	9,16	271392,01	5,07	379823,14	4,20	307793,48	3,44	158351,09	9,19
Fipronil	96725,31	17,95	241300,97	6,08	326390,05	2,89	333369,78	4,01	254178,64	5,66	162021,44	6,58

Pôde-se observar que a área das bandas dos agrotóxicos aumentou em função do aumento da concentração do surfactante até atingir um máximo de extração na concentração de 3,0 e 2,0 % (m/v) para o TX-100 e TX-114, respectivamente. Em concentrações superiores de surfactante, ocorreu um decréscimo nos valores de área dos analitos, fato que pode ter ocorrido pelo aumento do volume de surfactante e conseqüentemente a diluição dos analitos de interesse. Concentrações menores de surfactante são insuficientes para interagir completamente com as moléculas dos analitos em estudo, resultando em baixos valores de extração.

4.4.2 CONCENTRAÇÃO DO ELETRÓLITO (NaCl) NA ETAPA DE EXTRAÇÃO

Entre as variáveis que interferem na eficiência do procedimento de extração por ponto nuvem está a adição de eletrólitos ao meio reacional. Além de facilitar a separação de fases, a presença de eletrólitos pode eliminar a etapa de aquecimento, devido a diminuição da temperatura de ponto nuvem (efeito “*salting-out*”), e possível separação em temperatura ambiente. Os sais mais utilizados para o efeito “*salting-out*” são os sais de sódio e de potássio (BAI et al., 2001; LIANG; PENG; YAN, 2009; MUKHERJEE et al., 2011).

De acordo com Mortada, Hassanien e El-Asmy (2014), a adição do eletrólito na etapa de extração propicia a desidratação das cadeias hidrocarbônicas do surfactante, resultantes de interações eletrostáticas mais fortes entre sais e moléculas de água em comparação com as ligações de hidrogênio entre a parte polar do surfactante e as moléculas de água.

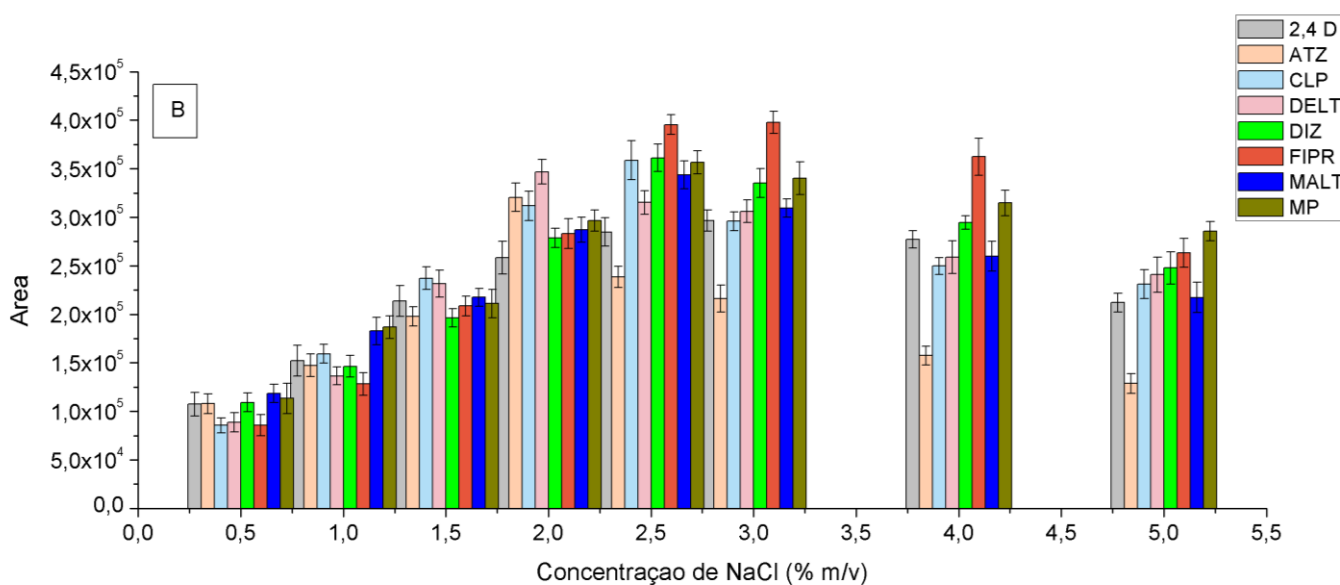
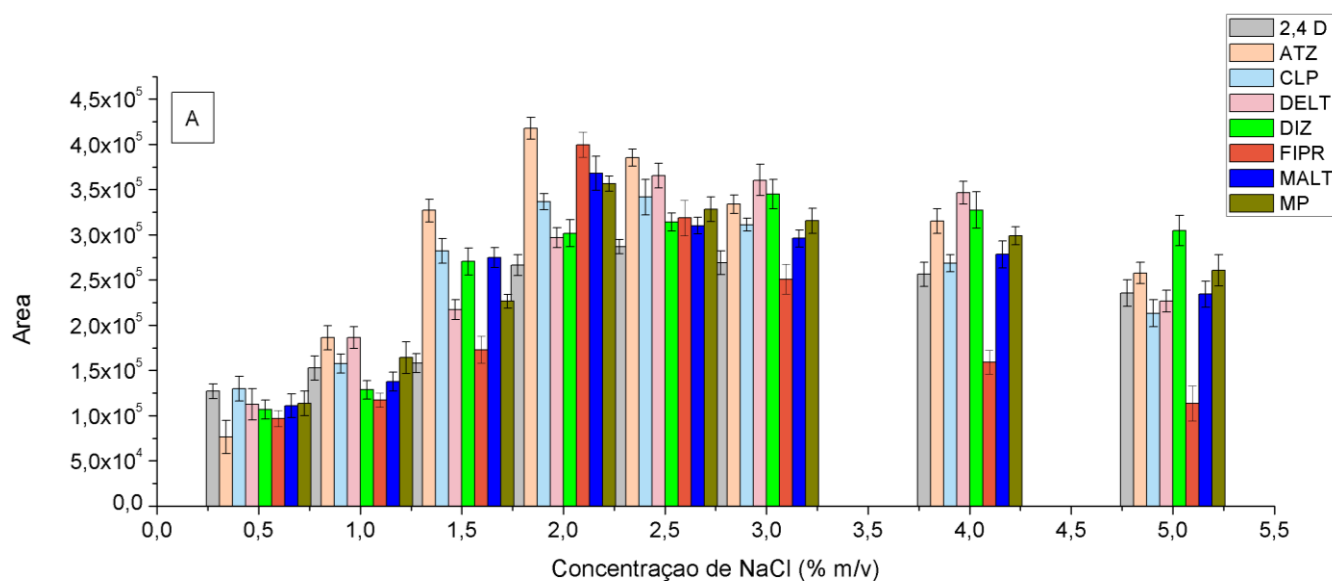
Nesse caso, as moléculas de água destinam-se principalmente à solvatação de íons salinos e deixam espaço para as interações de Van der Waals entre as moléculas de surfactantes durante a formação das micelas. Tal fato propicia uma diminuição na temperatura do ponto nuvem, possibilitando a separação de fases, em alguns casos, sem aquecimento.

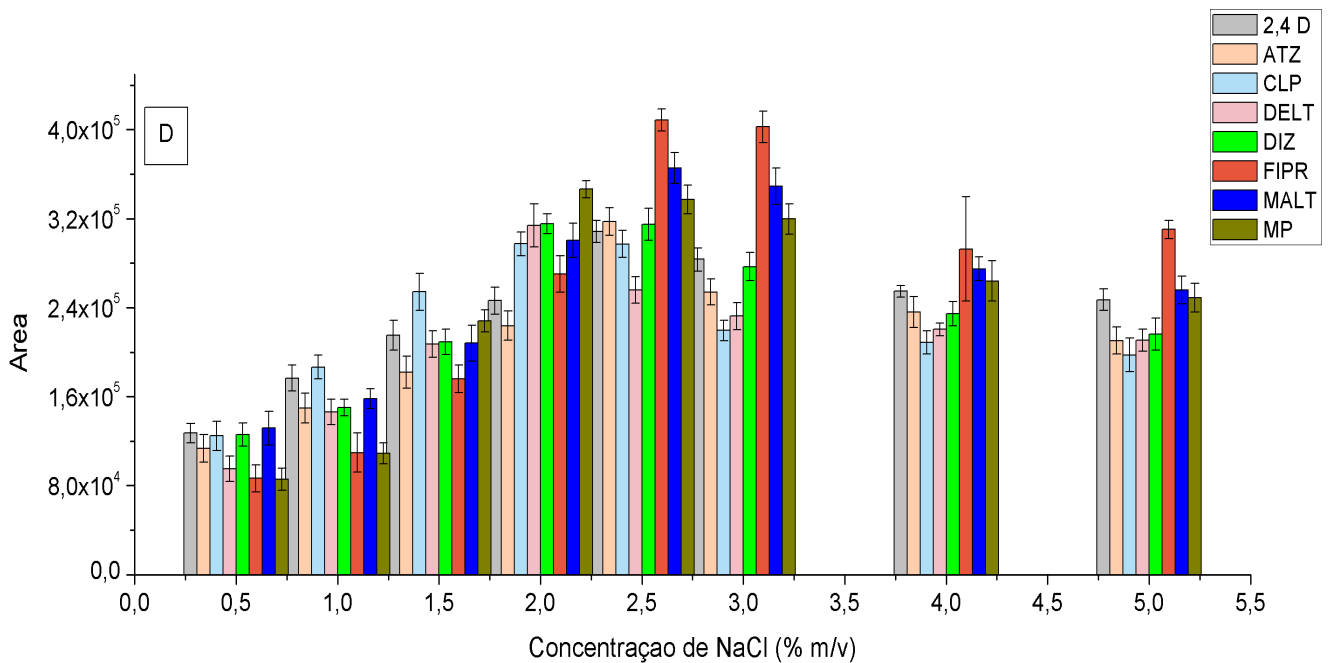
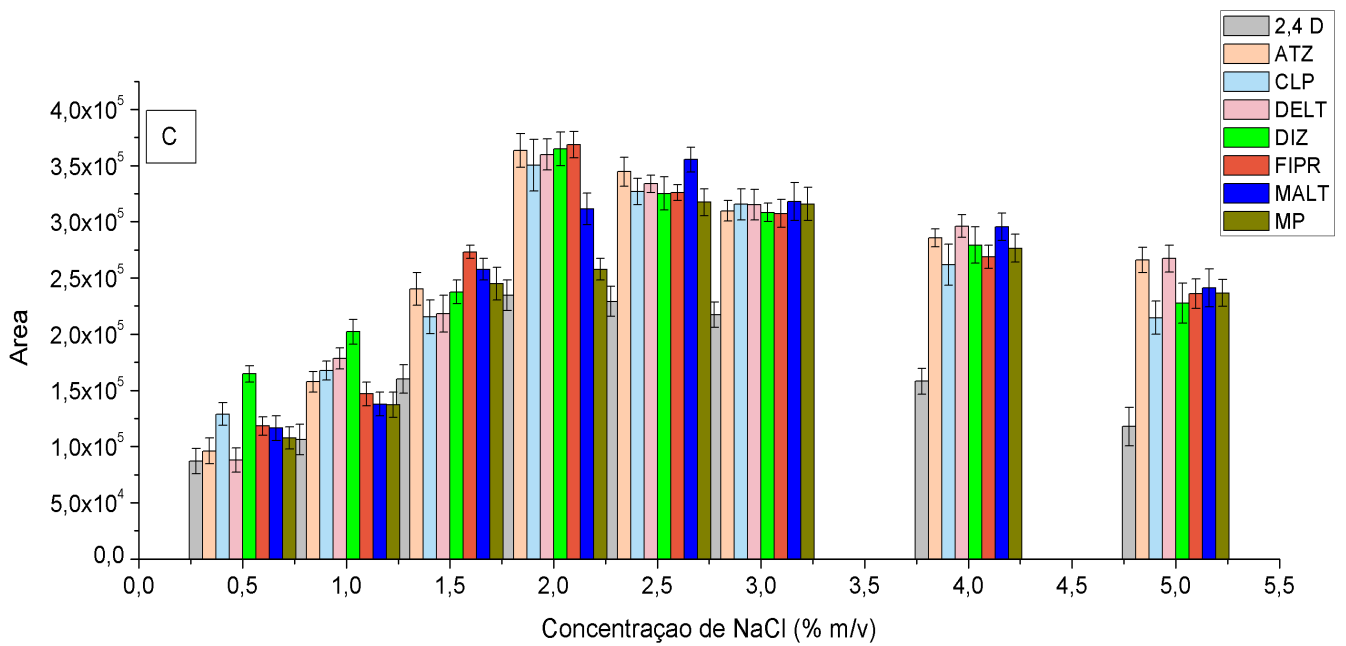
Ressalta-se que altas concentrações de sal podem aumentar a densidade da fase aquosa que possui a concentração de surfactante próxima à concentração micelar crítica perturbando a separação de fases. Por outro lado, a ausência de sal diminui a eficiência da extração devido a um aumento na temperatura do ponto nuvem, fato que pode ocasionar uma separação de fase incompleta à temperatura ambiente (MORTADA; HASSANIEN; EL-ASMY, 2014).

A influência da força iônica foi avaliada através da eficiência de extração dos agrotóxicos em estudo na concentração de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada agrotóxico na presença de diferentes concentrações de NaCl (Figura 6).

Os resultados demonstram que a presença do eletrólito NaCl, nas etapas de extração, influencia positivamente na extração por ponto nuvem, uma vez que as áreas obtidas aumentaram em função do aumento da força iônica (aumento da concentração) atingindo um máximo de extração na concentração de 2,0 % m/v para o TX-100 e de 2,5 % m/v para o TX-114.

Figura 6: Estudo da influência da concentração do eletrólito (NaCl) na etapa de extração dos agrotóxicos: matriz milho com TX-100 (A) e TX-114 (B); matriz mel com TX-100 (C) e TX-114 (D). CLP: clorpirifós; DELT: deltametrina; MP: metil paration; MALT: malation; DIZ: diazinon; ATZ: atrazina; FIPR: fipronil.





4.4.3 ESTUDO DO TEMPO DE AQUECIMENTO NA CPE

O aquecimento é uma variável importante na extração por ponto nuvem, uma vez que soluções micelares de surfactantes quando estão acima da temperatura do ponto nuvem separam-se em duas fases. Ao serem separadas, a fase rica em surfactante pode carregar consigo as moléculas apolares que estavam presentes na amostra aquosa. O fenômeno de

ponto nuvem é reversível e pode voltar a uma única fase quando a solução é resfriada para temperatura abaixo do ponto nuvem.

O fornecimento de energia promove, através de processos que envolvem entropia e entalpia, a competição das moléculas do analito entre a fase aquosa e a micela formada, assim como auxilia na separação das micelas da água. De acordo com Hinze e Pramauro (1993), a variação de entropia e entalpia proporcionada pela alteração da temperatura pode resultar num ponto consoluto, no qual os dois processos (competição e separação) atuam com a mesma amplitude. As Tabelas 8 e 9 mostram o estudo do efeito do tempo de aquecimento na extração dos agrotóxicos em estudo.

O aquecimento tem a capacidade de desidratar a camada externa de micelas de surfactantes não-iônicos, modificando a constante dielétrica da água, que decresce com elevação da temperatura, formando um solvente com menor interação em relação a porção hidrofílica do surfactante (HINZE; PRAMAURO, 1993). Outro fator a ser pontuado é que alguns agrotóxicos podem sofrer hidrólise com o aumento da temperatura, modificando o estado da molécula e, conseqüentemente, minimizando a interação analito/surfactante.

Tabela 8: Estudo da influência do tempo de aquecimento na etapa de extração dos agrotóxicos: matriz mel com TX-100 e TX-114.

TX 114 – MEL										
Compostos	Área 5 min	DPR (%)	Área 10 min	DPR (%)	Área 20 min	DPR (%)	Área 30 min	DPR (%)	Área 45 min	DPR (%)
Clorpirifós	108361,72	8,84	268346,21	6,41	309001,23	3,28	709418,33	2,37	394125,12	2,27
2,4 D	118318,21	6,95	164744,32	5,88	212670,14	5,52	389328,14	3,95	269401,22	5,46
Atrazina	153764,12	8,73	230467,65	6,54	309577,68	4,77	630434,85	1,81	406399,55	3,31
Malation	136149,56	9,28	308792,36	4,65	377966,75	2,79	769129,66	1,54	563934,18	3,05
Diazinon	106910,03	9,96	194509,32	3,23	3100952,47	2,67	671529,85	2,46	457270,86	2,49
Metil paration	195840,01	4,37	255175,26	5,17	376382,05	2,54	4971744,22	2,01	714959,23	2,66
Deltametrina	105879,23	7,73	235206,45	5,17	328261,48	3,18	730302,33	3,50	696386,46	1,35
Fipronil	116242,09	8,28	167924,66	6,92	317396,55	3,06	736449,78	2,06	611743,33	2,37
TX 100 – MEL										
Compostos	Área 5 min	DPR (%)	Área 10 min	DPR (%)	Área 20 min	DPR (%)	Área 30 min	DPR (%)	Área 45 min	DPR (%)
Clorpirifós	107357,20	10,76	169861,55	9,10	240559,65	6,63	409388,41	4,72	486177,66	2,50
2,4 D	67161,67	15,55	155767,95	7,78	208317,44	4,62	240491,36	6,53	287540,36	3,64
Atrazina	126115,22	6,11	217562,39	3,65	305637,15	4,03	346859,08	3,57	556421,18	2,04
Malation	116307,06	10,11	216115,41	6,87	225910,67	2,68	445062,87	3,63	451056,62	3,06
Diazinon	85220,32	10,40	200268,12	7,72	216787,06	4,25	344933,08	4,73	628373,26	1,53
Metil paration	37043,33	16,41	67789,21	14,05	208290,02	4,73	396891,54	2,68	575742,34	1,85
Deltametrina	86709,24	8,15	12556,24	7,51	11932,45	4,31	398319,77	2,67	517377,02	1,92
Fipronil	118116,57	9,12	170857,65	5,85	231590,24	6,51	437847,35	4,34	583762,86	2,87

Tabela 9: Estudo da influência do tempo de aquecimento na etapa de extração dos agrotóxicos: matriz milho com TX-100 e TX-114.

TX 114 – MILHO										
Compostos	Área 5 min	DPR (%)	Área 10 min	DPR (%)	Área 20 min	DPR (%)	Área 30 min	DPR (%)	Área 45 min	DPR (%)
Clorpirifós	108899,32	8,29	166833,21	7,52	226246,15	3,36	316084,44	4,83	519115,78	3,85
2,4 D	87171,05	11,48	196675,02	5,89	278524,14	5,14	397859,22	3,87	330630,65	2,78
Atrazina	201982,54	7,43	279971,26	4,73	384286,66	3,41	729050,77	2,39	517956,83	3,42
Malation	218016,02	5,39	330313,35	4,44	420390,14	2,83	520304,12	3,21	5057075,95	1,93
Diazinon	194691,22	4,41	280850,26	4,37	368066,18	3,77	719448,86	2,71	439392,60	3,08
metil paration	197827,36	5,11	276139,06	3,86	371391,87	4,13	409448,06	2,32	478582,33	2,77
deltametrina	97179,05	9,87	196865,05	5,11	314470,02	4,57	516190,63	2,61	376784,42	2,56
Fipronil	196185,63	4,91	236563,09	5,07	408626,77	2,61	720491,33	2,14	639010,04	2,29
TX 100 – MILHO										
Compostos	Área 5 min	DPR (%)	Área 10 min	DPR (%)	Área 20 min	DPR (%)	Área 30 min	DPR (%)	Área 45 min	DPR (%)
Clorpirifós	84290,23	18,75	151583,10	10,11	217848,69	4,89	385956,63	4,68	512603,33	2,61
2,4 D	112787,06	12,35	179718,35	7,10	238028,96	7,52	281213,23	5,15	330662,05	5,86
Atrazina	144897,32	14,03	202544,42	4,17	271067,09	5,47	347233,01	3,08	685967,89	1,91
Malation	175692,03	11,07	229538,10	5,28	358902,64	3,58	412092,63	5,01	436185,07	4,77
Diazinon	102014,25	15,18	221219,65	7,92	244554,12	7,08	417529,09	5,30	600064,33	1,68
metil paration	63220,02	16,08	113483,74	13,85	215811,33	7,87	399539,56	3,01	576811,06	2,96
deltametrina	68674,23	15,92	113235,95	12,86	251538,08	6,78	334739,01	4,74	589350,42	1,81
Fipronil	88121,23	11,01	117118,56	18,79	201935,04	8,18	281234,26	9,02	326187,65	6,87

Os resultados observados nas Tabelas 8 e 9 indicam que a área das bandas dos agrotóxicos aumentam em função do aumento do tempo de contato durante o aquecimento entre analito e surfactante atingindo um máximo de extração no tempo de 45 min para o TX-100 e de 30 min para o TX-114.

4.5. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA CPE DESENVOLVIDA

O método CPE otimizado utilizando os surfactantes Triton X – 100 e Triton X – 114 foram aplicados em amostras de mel e milho nas quais não foram detectados os agrotóxicos investigados (amostra testemunha ou amostra branco). Após observar que as amostras analisadas não apresentavam interferentes ou contaminação pelos reagentes utilizados nas etapas de extração e análise cromatográfica iniciou-se a validação da metodologia CPE para determinação dos agrotóxicos em estudo por HPLC-UV. As figuras de mérito analisadas foram limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), seletividade, linearidade, faixa de trabalho, efeito de matriz, exatidão e precisão.

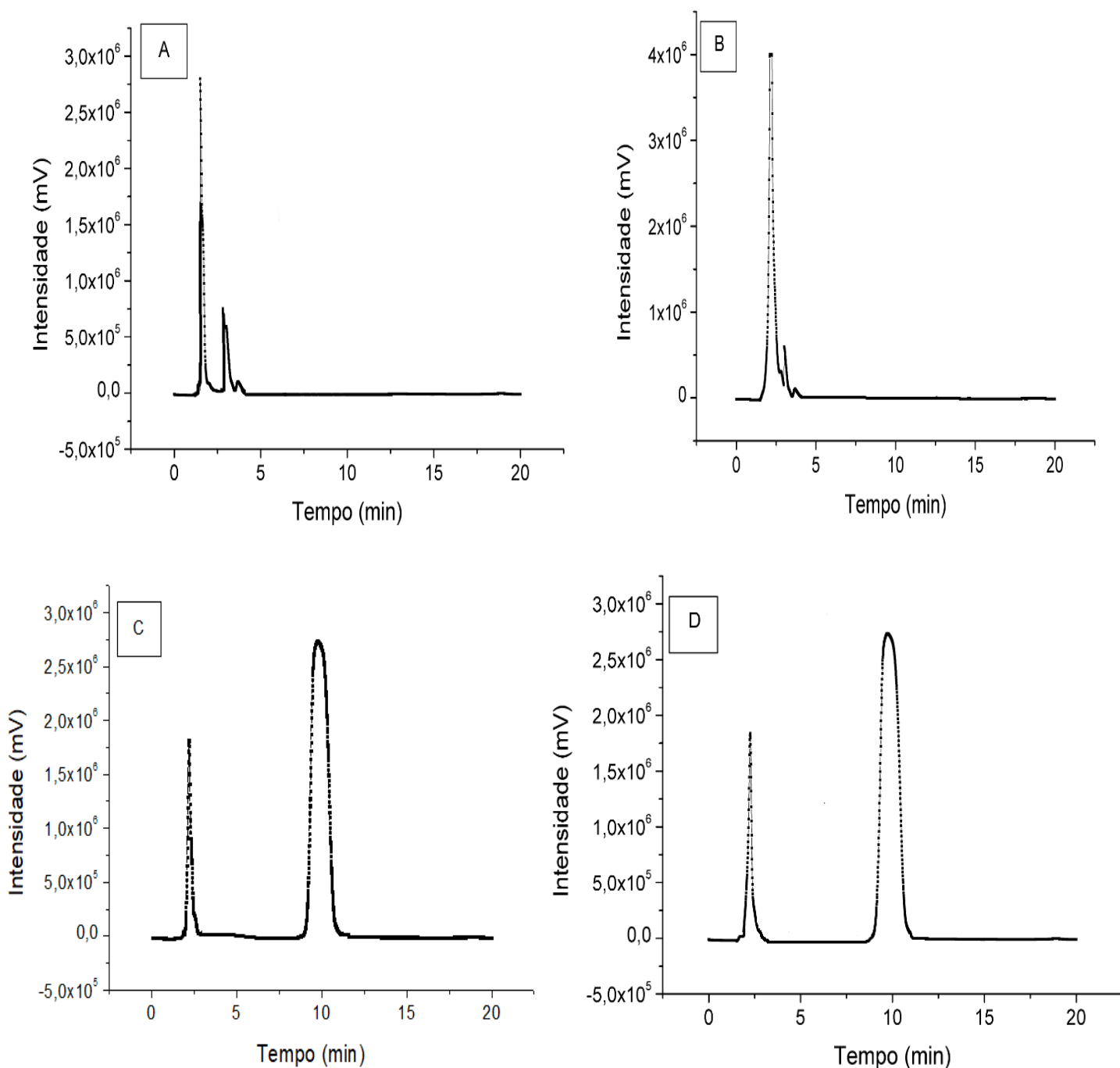
4.5.1 SELETIVIDADE

A seletividade do método foi avaliada afim de identificar a presença de possíveis interferentes presentes na matriz das amostras analisadas e que estivessem nos mesmos tempos de retenção que os agrotóxicos em estudo.

De acordo com os guias utilizados para validação deste capítulo quando se compara cromatogramas de analitos preparados em solvente e em extratos das amostras analisadas as bandas cromatográficas devem apresentar pequena variação no tempo de retenção e formato semelhantes. Caso um desses parâmetros apresente divergência, a quantificação do analito torna-se não confiável devido as interferências analíticas. Neste caso é necessário rever os parâmetros cromatográficos, reagentes e solventes utilizados, além do preparo de amostras a fim de identificar a fonte de interferência e erradicá-la (SANTE, 2017).

A Figura 7 apresenta os cromatogramas obtidos por HPLC-UV dos extratos das amostras (isentas dos agrotóxicos), obtidos após aplicação do método CPE otimizado. Percebe-se a inexistência de bandas cromatográficas nos mesmos tempos de retenção dos compostos de interesse que ocorre entre 3,0 e 16,8 min.

Figura 7: Cromatogramas obtidos por HPLC-UV dos extratos das amostras para estudos de seletividade: Matriz milho sem extração por CPE (A); Matriz mel sem extração por CPE (B); Matriz milho com extração por CPE (C); Matriz mel com extração por CPE (D).



4.5.2 FAIXA DE TRABALHO E LINEARIDADE

Para avaliar a faixa de trabalho e linearidade do método proposto foram construídas duas curvas analíticas: uma com os agrotóxicos extraídos pelo método CPE (curva com pré-

concentração) e outra com as soluções dos agrotóxicos preparadas em solvente (acetonitrila) (curva sem pré-concentração). Determinou-se alguns parâmetros analíticos, tais como linearidade e faixa dinâmica de trabalho (range) para cada composto. Os parâmetros estudados são apresentados nas Tabelas 10 e 11 considerando as respostas obtidas nas curvas com e sem extração.

Tabela 10: Parâmetros obtidos para as curvas analíticas dos agrotóxicos preparadas em solvente.

<i>Analitos</i>	<i>Faixa de trabalho</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>Padrão externo (solvente)</i>	
		Linearidade (R^2)	Sensibilidade ($\text{mL}^{-1} \mu\text{g}$)
<i>2,4 D</i>	0,08-2,5	0,9992	114814
<i>Atrazina</i>	0,08-2,5	0,9929	129341
<i>Clorpirifós</i>	0,08-2,5	0,9983	107502
<i>Deltametrina</i>	0,08-2,5	0,9969	83670
<i>Diazinon</i>	0,08-2,5	0,9905	81260
<i>Fipronil</i>	0,1-2,5	0,9953	72271
<i>Malation</i>	0,08-2,5	0,9977	105238
<i>Metil Paration</i>	0,1-2,5	0,9996	75139

Tabela 11: Parâmetros obtidos para as curvas analíticas dos agrotóxicos preparadas na matriz de cada amostra empregando o método CPE (TX-100 e TX-114).

Analito	Faixa de trabalho ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Triton X-114		Triton X-100	
		Linearidade (R^2)	Sensibilidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Linearidade (R^2)	Sensibilidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
MILHO					
2,4 D	0,010-1,0	0,9908	242108	0,9918	332981
Atrazina	0,010-1,0	0,9907	879319	0,9904	918432
Clorpirifós	0,010-1,0	0,9926	806066	0,9900	645012
Deltametrina	0,010-1,0	0,9980	443361	0,9909	317996
Diazinon	0,010-1,0	0,9904	349619	0,9908	300863
Fipronil	0,010-1,0	0,9919	346909	0,9903	375907
Malation	0,010-1,0	0,9904	610481	0,9930	515867
Metil Paratior	0,010-1,0	0,9901	315784	0,9919	270626
MEL					
2,4 D	0,010-1,0	0,9962	401850	0,9956	321580
Atrazina	0,010-1,0	0,9907	995990	0,9905	1086485
Clorpirifós	0,010-1,0	0,9906	860017	0,9907	688113
Deltametrina	0,010-1,0	0,9903	460286	0,9902	301319
Diazinon	0,010-1,0	0,9906	455097	0,9905	365881
Fipronil	0,010-1,0	0,9934	440870	0,9927	318009
Malation	0,010-1,0	0,9992	663004	0,9908	399987
Metil Paratior	0,010-1,0	0,9901	510999	0,9948	465913

As faixas de trabalho para os resíduos de agrotóxicos empregando o método CPE com ambos surfactantes foi escolhida considerando o LMR (limite máximo de resíduos), o qual está entre os valores analisados para obtenção de cada curva. Para todos os agrotóxicos avaliados, empregando o método de extração CPE, os coeficientes de determinação obtidos a partir das equações das curvas foram todos maiores que 0,99, demonstrando a excelente linearidade do método, além de estar em acordo com os protocolos de validação de métodos de determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos utilizados neste capítulo (MAPA, 2011; SANTE, 2017).

Os fatores de pré-concentração (Tabela 12) foram calculados por meio da razão entre os coeficientes angulares das curvas analíticas de calibração preparadas em solvente (Tabela 10) e obtidas com processo de extração CPE (Tabela 11).

Tabela 12: Fatores de pré-concentração obtidos com método CPE otimizado utilizando os surfactantes TX-100 e TX-114.

<i>Analito</i>	MILHO		MEL	
	TX-114	TX-100	TX-114	TX-100
<i>2,4 D</i>	2,1	2,9	3,5	2,8
<i>Atrazina</i>	6,8	7,1	7,7	8,4
<i>Clorpirifós</i>	7,5	6,0	8,0	6,4
<i>Deltametrina</i>	5,3	3,8	5,5	3,6
<i>Diazinon</i>	4,3	3,7	5,6	4,5
<i>Fipronil</i>	4,8	5,2	6,1	4,4
<i>Malation</i>	5,8	4,9	6,3	3,8
<i>Metil Paration</i>	4,2	3,6	6,8	6,2

Ao observar os resultados dos fatores de pré-concentração (Tabela 12) de cada agrotóxico nas matrizes estudadas, nota-se que o composto 2,4 D apresentou os menores valores de pré-concentração. Tal situação ocorre pelo fato desse composto estar ionizado durante o processo de extração, não interagindo de maneira adequada com os surfactantes não iônicos utilizados.

Os fatores de pré-concentração dos agrotóxicos em análise foram considerados satisfatórios, uma vez que além das matrizes analisadas possuírem vários elementos constituintes complexos que poderiam interferir na etapa de extração e consequentemente resultado final, também possibilitam analisar amostras complexas com baixas concentrações de analito, as quais não poderiam ser analisadas por técnicas de extração convencional, auxiliando na comparação dos resultados obtidos com as concentrações baixas exigidas pela

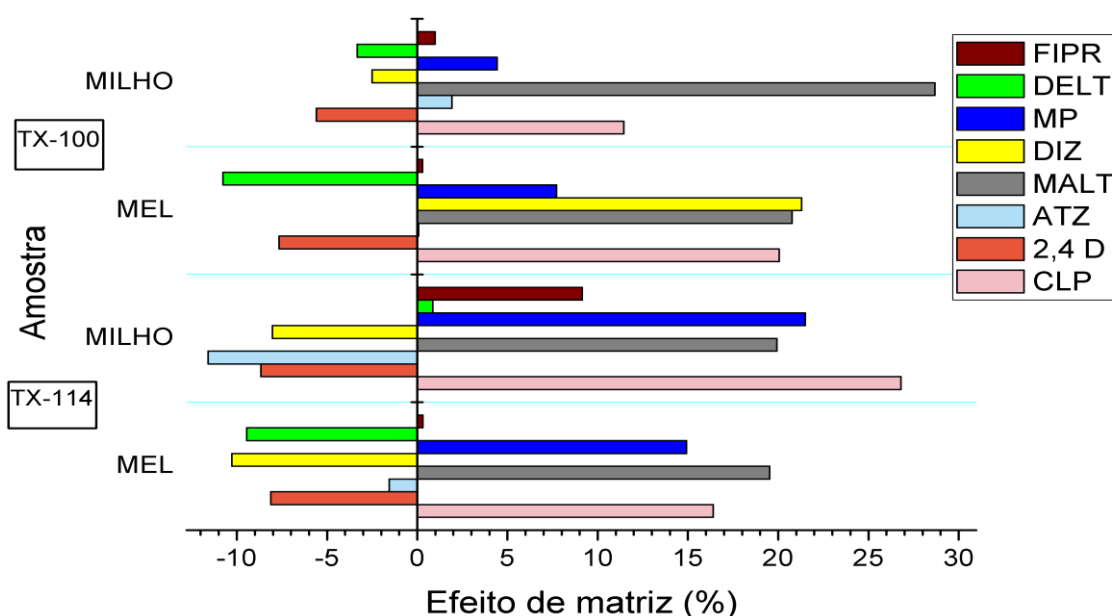
legislação através do limite máximo de resíduos de cada agrotóxico (LMR) (ALVES et al., 2010; VIEIRA, 2004).

4.5.3 EFEITO MATRIZ

O efeito de matriz deve ser considerado e estimado em análises quantitativas evitando ou minimizando possíveis resultados errôneos, visto que os componentes da matriz podem melhorar ou suprimir o sinal dos analitos. No caso da cromatografia líquida, os componentes da matriz podem interagir com a coluna cromatográfica e modificar o tempo de retenção dos analitos, assim como ocasionar o alargamento de banda ou sobreposição de picos.

Para reduzir os efeitos da matriz é importante preparar a amostra adequadamente e otimizar a metodologia para que haja uma eficiente separação cromatográfica. A Figura 8 mostra os resultados do efeito de matriz na recuperação dos agrotóxicos a partir da relação de soluções preparadas em solvente (acetonitrila) e nos extratos das matrizes obtidos pelo método CPE com Triton X – 100 e Triton X – 144.

Figura 8: Efeito de matriz observado na relação entre soluções preparadas em solvente e no extrato das matrizes empregando o método CPE com TX-100 (A) e TX-114 (B). CLP: clorpirifós; DELT: deltametrina; MP: metil paration; MALT: malation; DIZ: diazinon; ATZ: atrazina; FIPR: firponil.



Ao aplicar o método CPE utilizando o TX-114 observa-se que o efeito de matriz variou de -11,6 com o agrotóxico atrazina a 26,8 com o clorpirifós na matriz de milho. Já com a matriz de mel variou-se de -10,3 com o agrotóxico diazinon a 19,5 com o malation. Em relação ao uso do TX-100 observou-se uma variação de -5,6 com o 2,4 D a 28,7 com malation na matriz de milho. Na matriz de mel observou-se variação de -10,8 com a deltametrina a 21,3 com o diazinon.

Por meio da Figura 8 pode-se observar que apesar da técnica CPE promover um clean-up das matrizes analisadas, removendo com eficiência os componentes interferentes, em algumas matrizes ainda é perceptível o efeito de matriz nos resultados de recuperação, principalmente para os agrotóxicos malation e clorpirifós. De acordo com Walorczyk (2014), o efeito de matriz pode ser considerado significativo quando o valor obtido estiver na faixa superior de -20% a +20%. Tal situação pode ser solucionada preparando as soluções dos agrotóxicos nas amostras analisadas e construindo as curvas analíticas pelo método da calibração na matriz afim de minimizar o efeito de matriz.

4.5.4 LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO E DE DETECÇÃO APÓS CPE

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos através da relação sinal/ruído para cada um dos agrotóxicos estudados. Os valores de LD obtidos empregando o método CPE com Triton X 100 e Triton X 114 foram de 0,0005 mg kg⁻¹ para deltametrina, clorpirifós, malation e metil paration e 0,0008 mg kg⁻¹ para o 2,4 D, diazinon, fipronil e atrazina.

A Tabela 13 mostra os valores de LQ obtidos para cada agrotóxico após a etapa de extração por Ponto Nuvem com Triton X-100 e Triton X-114, assim como os limites máximos de resíduos de agrotóxicos (LRM) padronizados por órgãos internacionais responsáveis por limitar o nível de agrotóxico de cada matriz analisada.

Tabela 13: Valores de limite de quantificação (LQ) e limite máximo de resíduos (LMR) segundo o MAPA¹, EU² e CODEX ALIMENTARIUS³ para os agrotóxicos em estudo nas matrizes analisadas.

Analito	TX-100	TX-114	LMR ¹ (mg kg ⁻¹)	LMR ² (mg kg ⁻¹)	LMR ³ (mg kg ⁻¹)
	LQ (mg kg ⁻¹)	LQ (mg kg ⁻¹)			
MILHO					
2,4 D	0,008	0,005	0,2	0,05	0,05
Atrazina	0,005	0,005	0,25	0,05	NA
Clorpirifós	0,008	0,005	0,1	0,01	NA
Deltametrina	0,008	0,008	1,0	0,02	0,02
Diazinon	0,006	0,006	NA	0,02	NA
Fipronil	0,006	0,005	0,01	0,05	0,01
Malation	0,006	0,005	8,0	0,02	0,05
Metil Paration	0,005	0,007	NA	0,02	NA
MEL					
2,4 D	0,006	0,008	NA	0,05	NA
Atrazina	0,008	0,005	NA	0,05	NA
Clorpirifós	0,007	0,007	0,02	0,05	NA
Deltametrina	0,008	0,008	0,034	0,05	NA
Diazinon	0,008	0,008	NA	0,01	NA
Fipronil	0,008	0,005	NA	0,005	NA
Malation	0,006	0,004	0,01	0,05	NA
Metil Paration	0,005	0,006	0,037	0,01	NA

Os valores obtidos para o LQ (Tabela 13) são bem inferiores aos estabelecidos por órgãos orientadores e fiscalizadores brasileiros e internacionais através do limite máximo de resíduos (LMR) para os agrotóxicos estudados. No Brasil a orientação sobre o LMR é de responsabilidade do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2000). Comparações com órgãos internacionais são realizadas considerando o Codex Alimentarius, que é um programa conjunto da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Comissão Europeia (EU Pesticides), os quais estabelecem limites seguidos por inúmeros países.

Os valores de LQ para os resíduos de agrotóxicos obtidos pelo método CPE são inferiores também a outras metodologias propostas para determinação de resíduos de agrotóxicos nas matrizes analisadas, empregando diferentes métodos de preparação de amostras e técnicas analíticas na literatura (Tabela 14). Essa alta detectabilidade do método proposto está associada a capacidade de pré-concentração que o uso de surfactante proporciona possibilitando a obtenção de resultados satisfatórios em análises de matrizes complexas.

4.5.5 EXATIDÃO E PRECISÃO (RECUPERAÇÃO)

Para avaliar a exatidão da metodologia de determinação dos resíduos de agrotóxicos por CPE ensaios de recuperação foram realizados. Para tanto, cada amostra foi fortificada em três níveis de concentração ($0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$; $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$; $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), aplicou-se o método CPE otimizado com posterior detecção e quantificação por HPLC-UV. Cada nível de concentração foi analisado através de 6 réplicas para cada amostra. A precisão do método nos ensaios de recuperação foi avaliada através do desvio padrão relativo (DPR). Os resultados de recuperação obtidos pelo método CPE são apresentados na Tabela 14, 15 e 16.

Tabela 14: Taxas de recuperação dos resíduos de agrotóxicos empregando o método CPE, n=6 (1º dia).

Analito	MILHO																	
	TX-100			TX-114			TX-100			TX-114			TX-100			TX-114		
	0,03 µg mL ⁻¹			0,03 µg mL ⁻¹			0,5 µg mL ⁻¹			0,5 µg mL ⁻¹			1,0 µg mL ⁻¹			1,0 µg mL ⁻¹		
	R (%)	DPR (%)	T	R (%)	DPR (%)	t	R (%)	DPR (%)	t	R (%)	DPR (%)	t	R (%)	DPR (%)	t	R (%)	DPR (%)	t
2,4 D	58,3	6,4	-2,7	59,7	5,1	-3,23	60,0	5,2	-3,12	77,5	8,6	-1,08	73,1	4,1	-2,7	71,1	6,1	-1,92
Atrazina	60,9	4,2	-3,83	67,5	8,6	-1,55	71,3	3,6	-3,25	77,2	9,0	-1,03	77,8	5,8	-1,57	76,8	7,2	-1,31
Clorpirifós	83,4	10,5	-0,64	91,8	6,5	-0,52	94,6	7,6	-0,29	91,0	6,6	-0,60	95,9	8,4	-0,20	98,5	5,9	-0,11
Deltametrina	90,4	5,8	-0,68	94,8	8,4	-0,25	99,3	8,0	-0,03	101,3	7,8	0,07	93,2	6,1	-0,46	97,0	10,0	-0,13
Diazinon	87,3	9,9	-0,52	94,1	8,0	-0,30	93,3	5,0	-0,05	92,2	10,1	-0,32	90,1	6,7	-0,61	92,6	5,8	-0,53
Fipronil	91,3	6,3	-0,57	98,2	5,9	-0,13	101,1	8,3	0,05	101,3	7,1	0,07	98,1	4,5	-0,17	97,3	7,0	-0,16
Malation	71,2	6,3	-1,87	76,3	10,3	-0,94	78,5	8,1	-1,08	79,0	10,0	-0,90	81,7	7,5	-0,99	84,6	11,5	-0,54
Metil Paration	79,3	5,6	-1,52	75,6	12,1	-0,83	86,0	5,2	-1,11	87,3	10,0	-0,53	88,7	4,9	-0,95	88,7	8,9	-0,52
	MEL																	
2,4 D	48,3	8,9	-2,39	61,6	9,7	-1,61	68,9	14,3	-0,89	82,7	8,8	-0,81	85,0	11,0	-0,56	93,2	14,0	-0,20
Atrazina	95,7	7,3	-0,24	102,7	11,0	0,10	100,1	6,8	0,003	97,8	10,2	-0,09	112,3	4,5	1,12	102,8	10,7	0,11
Clorpirifós	88,0	8,6	-0,57	106,6	6,2	0,43	97,6	8,5	-0,11	95,7	11,8	-0,15	99,1	8,7	-0,04	105,2	8,8	0,24
Deltametrina	97,8	9,5	-0,10	108,5	8,0	0,44	101,7	7,8	0,09	103,7	6,6	0,23	104,8	6,0	0,32	104,7	5,2	0,37
Diazinon	103,5	7,1	0,20	103,8	8,6	0,18	100,4	6,7	0,03	94,0	10,4	-0,24	103,7	5,3	0,28	95,7	12,3	-0,14
Fipronil	98,3	9,7	-0,07	95,5	10,0	-0,19	88,9	4,9	-0,93	89,1	7,7	-0,58	97,3	10,1	-0,11	97,6	9,4	-0,11
Malation	66,1	9,7	-1,43	80,0	11,1	-0,73	81,6	8,5	-0,88	87,0	6,8	-0,78	86,6	8,3	-0,67	85,8	10,2	-0,57
Metil Paration	77,4	8,5	-1,09	86,7	9,2	-0,60	102,3	7,0	0,13	102,5	8,9	0,11	100,9	7,5	0,05	96,6	9,2	-0,15

Tabela 15: Recuperação dos resíduos de agrotóxicos empregando o método CPE, n=6 (2º dia).

MILHO																		
Analito	TX-100			TX-114			TX-100			TX-114			TX-100			TX-114		
	0,03 µg mL ⁻¹			0,5 µg mL ⁻¹			0,5 µg mL ⁻¹			1,0 µg mL ⁻¹			1,0 µg mL ⁻¹					
	R (%)	DPR (%)	t	R (%)	DPR (%)	t	R (%)	DPR (%)	t	R (%)	DPR (%)	t	R (%)	DPR (%)	t	R (%)	DPR (%)	t
2,4 D	61,0	7,0	-2,31	62,1	7,6	-2,05	63,3	8,7	-1,72	78,6	9,1	-0,96	75,6	6,3	-1,59	75,6	7,7	-1,31
Atrazina	63,8	5,0	-2,96	68,5	11,9	-1,08	74,3	7,8	-1,35	81,1	12,8	-0,60	81,5	7,0	-1,09	78,2	8,2	-1,10
Clorpirifós	94,0	9,6	-0,26	96,4	5,2	-0,28	98,9	6,9	-0,07	96,4	6,1	-0,24	98,3	8,0	-0,09	103,9	5,8	0,30
Deltametrina	94,0	9,1	-0,27	105,4	7,9	0,28	103,5	5,4	0,27	104,5	9,9	0,19	95,9	6,0	-0,28	95,8	14,6	-0,118
Diazinon	93,6	8,0	-0,32	100,0	9,3	-0,007	93,2	5,3	-0,52	95,0	11,4	-0,18	95,7	13,2	-0,13	90,0	8,0	-0,51
Fipronil	94,0	9,6	-0,26	103,3	7,9	0,17	95,6	14,8	-0,13	103,2	8,2	0,16	103,2	7,9	0,16	99,6	4,4	-0,04
Malation	73,6	7,5	-1,44	80,4	12,7	-0,63	81,9	12,0	-0,61	81,4	11,0	-0,70	83,6	9,5	-0,71	82,9	13,7	-0,51
Metil Paration	82,1	5,0	-1,46	67,1	14,9	-0,91	90,2	8,7	-0,46	89,3	11,2	-0,39	92,6	6,2	-0,49	91,1	14,2	-0,26
MEL																		
2,4 D	48,3	8,9	-2,40	66,3	8,0	-1,71	65,4	12,3	-1,12	84,6	7,3	-0,86	88,0	10,9	-0,45	78,4	9,8	-0,90
Atrazina	97,4	5,5	-0,20	105,2	7,0	0,30	105,4	4,9	0,46	106,0	4,8	0,51	110,7	4,0	1,08	107,5	5,2	0,60
Clorpirifós	89,5	6,7	-0,63	107,6	5,1	0,61	105,6	10,6	0,22	88,2	6,6	-0,74	103,4	8,6	0,16	94,5	13,2	-0,17
Deltametrina	103,5	9,5	0,16	110,3	6,5	0,65	106,9	4,4	0,64	106,9	3,2	0,90	98,8	8,7	-0,06	93,7	6,7	-0,38
Diazinon	108,3	2,8	1,23	108,5	4,8	0,73	97,1	10,8	-0,11	96,3	7,7	-0,20	99,1	9,4	-0,04	100,8	13,1	0,02
Fipronil	101,8	7,7	0,10	88,0	6,6	-0,75	93,4	7,35	-0,36	92,4	7,4	-0,42	102,4	5,2	0,19	89,0	7,5	-0,60
Malation	70,2	10,6	-1,15	77,8	9,2	-0,99	76,3	9,2	-1,06	90,6	6,1	-0,63	84,7	9,0	-0,70	91,5	11,3	-0,31
Metil Paration	75,6	9,0	-1,11	80,4	10,7	-0,75	105,5	6,9	0,33	108,2	3,4	0,98	106,0	4,6	0,53	102,6	11,4	0,09

Tabela 16: Taxas de recuperação dos resíduos de agrotóxicos empregando o método CPE, n=6 (3º dia).

MILHO																		
Analito	TX-100			TX-114			TX-100			TX-114			TX-100			TX-114		
	0,03 µg mL ⁻¹			0,03 µg mL ⁻¹			0,5 µg mL ⁻¹			0,5 µg mL ⁻¹			1,0 µg mL ⁻¹			1,0 µg mL ⁻¹		
	R (%)	DPR (%)	T	R (%)	DPR (%)	t	R (%)	DPR (%)	t	R (%)	DPR (%)	t	R (%)	DPR (%)	t	R (%)	DPR (%)	t
2,4 D	54,3	4,2	-4,44	56,4	4,1	-4,35	60,0	5,2	-3,20	74,2	5,1	-2,06	68,1	7,6	-1,71	66,2	11,8	-1,18
Atrazina	65,2	4,1	-3,45	64,4	9,3	-1,60	76,4	7,6	-1,26	75,2	8,1	-1,26	80,7	3,8	-2,06	79,5	6,2	-1,36
Clorpirifós	86,0	9,3	-0,62	94,5	3,8	-0,59	99,7	8,6	-0,02	97,5	6,6	-0,16	98,3	9,4	-0,07	102,8	4,2	0,27
Deltametrina	94,9	8,8	-0,24	102,4	7,8	0,12	105,1	6,5	0,32	106,5	2,9	0,92	94,6	7,1	-0,31	99,6	9,1	-0,02
Diazinon	89,3	11,1	-0,40	96,4	7,7	-0,19	94,0	11,0	-0,22	98,0	11,2	-0,07	94,7	11,4	-0,19	94,7	5,2	0,42
Fipronil	94,3	7,9	-0,30	103,7	4,7	0,33	103,8	5,2	0,30	102,9	4,81	0,24	103,7	7,2	0,21	99,6	7,1	-0,025
Malation	74,2	4,1	-2,60	78,1	10,6	-0,84	90,5	13,6	-0,29	81,3	12,2	-0,63	82,7	7,8	-0,91	88,5	9,4	-0,50
Metil Paration	82,3	6,11	-1,20	90,3	14,5	-0,27	95,8	12,0	-0,14	92,3	15,2	-0,21	90,0	5,3	-0,77	90,6	7,0	-0,56
MEL																		
2,4 D	47,0	9,0	-2,43	58,4	10,1	-1,70	64,0	12,8	-1,15	80,0	10,0	-0,81	83,0	12,0	-0,58	77,6	11,0	-0,83
Atrazina	100,0	6,2	0,002	97,1	8,3	-0,14	104,2	6,1	0,28	104,0	11,3	0,14	99,9	11,2	-0,004	109,4	5,2	0,74
Clorpirifós	89,8	9,4	-0,45	98,8	7,3	-0,07	88,4	8,4	-0,57	99,7	8,8	-0,02	93,3	6,5	-0,42	107,2	5,7	0,52
Deltametrina	100,2	9,2	0,01	98,5	8,9	-0,07	95,2	7,3	-0,27	108,1	3,6	0,91	107,6	4,6	0,67	105,3	4,5	0,48
Diazinon	106,3	6,5	0,40	107,9	5,3	0,61	104,8	7,7	0,26	96,3	9,2	-0,16	100,6	5,0	0,045	102,1	9,8	0,09
Fipronil	103,0	9,2	0,13	102,0	7,0	0,12	87,0	5,3	-1,01	90,6	8,0	-0,49	102,0	8,7	0,09	99,7	7,4	-0,014
Malation	69,5	9,8	-1,28	82,3	12,0	-0,61	86,0	8,1	-0,71	92,7	7,8	-0,39	91,0	14,3	-0,26	90,8	6,8	-0,55
Metil Paration	79,0	7,2	-1,21	88,2	8,0	-0,60	106,1	8,3	0,30	107,6	3,40	0,78	109,4	9,0	0,43	104,4	6,2	0,30

De acordo com as Tabelas 14, 15 e 16 ao aplicar o método de extração por ponto nuvem, as taxas de recuperação variaram na faixa de 47,0 a 112,3%. Com exceção do 2,4 D, os demais agrotóxicos apresentaram resultados dentro do critério estabelecido pelos documentos oficiais considerados neste trabalho que é de 70 a 120% (MAPA, 2011; SANTE, 2017). O composto 2,4 D apresentou os menores valores de recuperação em todos os níveis de concentração e matrizes estudadas. Isso ocorre pelo fato desse analito encontrar-se em estado ionizado durante o processo de extração dificultando a interação entre o analito e o surfactante não iônico, o qual interage melhor com analitos eletricamente neutros.

O composto que apresentou os melhores valores de recuperação em todos os níveis de concentração foi a deltametrina nas matrizes de mel e o fipronil na matriz de milho. Em relação ao desvio padrão relativo, os valores variaram na faixa de 2,8 e 14,9%, estando dentro da faixa aceitável de acordo com o protocolo de validação de métodos de determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos proposto pela Comunidade Europeia – documento SANTE/11813/2017 (SANTE, 2017).

Com relação ao teste de Student (Teste t), com 95% de confiança, os valores de t calculados apresentaram valores menores que o valor crítico tabelado ($t_{95\%} = 2,57$), para todos os níveis de concentração e nos três dias investigados, garantindo a exatidão do método.

Considerando a complexidade das matrizes analisadas, os bons resultados de exatidão e precisão alcançados nas análises dos agrotóxicos nas concentrações definidas como LQ (menor concentração de análise), assim como nas demais concentrações pode-se definir o método CPE-HPLC/UV como satisfatório e com boa detectabilidade em diferentes concentrações. A Tabela 17 apresenta o comparativo das características do método proposto com outros métodos desenvolvidos para a determinação de agrotóxicos em diferentes amostras.

Tabela 17: Limites de detecção e quantificação e resultados de recuperação em variadas matrizes para os agrotóxicos analisados neste trabalho e utilizando diferentes métodos de extração e análise.

Matriz	Agrotóxicos	Método de extração	Técnica analítica	Solvente de extração	LD	LQ	Recuperação (%)	Referência
Mel	clorpirifós, deltametrina, fipronil, metil paration, diazinon, malation e mais 201 agrotóxicos.	QuEChERS acetato	LCMS/MS e GCMS/MS	Acetonitrila	—	0,001 – 0,01 mg kg ⁻¹	63-128%	GAWEŁ et al., 2019
Mel	clorpirifós, fipronil, malation, deltametrina e mais 31 pesticidas.	SPE	GCMS	Acetonitrila	—	0,001 – 0,05 mg kg ⁻¹	70,5-127,5%	RAFIQUE et al., 2018
Frutas e vegetais	clorpirifos, diazinon e mais 6 pesticidas.	QuEChERS-dispersivo modificado seguido de DLLME à base de líquido iônico	LC-MS/MS	acetoneitrila e solução aquosa de NaCl 10%	0,00001 – 0,00054 mg kg ⁻¹	0,00003 – 0,00179 mg kg ⁻¹	89-138%	LAWAL et al., 2019
Frutas e vegetais	clorpirifos, deltametrina, diazinon, malation e mais 31 pesticidas.	QuEChERS	LC-MS/MS e CG-MS	Acetonitrila	0,0007-0,214 mg kg ⁻¹	0,0029-0,4521 mg kg ⁻¹	79-106%	JALLOW et al., 2017
Leite	atrazina e mais 5 pesticidas.	EPN	HPLC-UV	Triton X 100	6,79-11,19 µg L ⁻¹	50-2000 µg L ⁻¹	70,5-96,9%	LIU et al., 2014
Leite	atrazina e mais 4 pesticidas.	Extração aquosa em duas fases	HPLC-UV	acetoneitrila-K ₂ HPO ₄	2,1-2,6 µg L ⁻¹	6,9-9,4 µg L ⁻¹	86,3-120,6%	YANG et al., 2014
Milho	clorpirifos, malation, deltametrina e mais 11 pesticidas.	QuEChERS modificado	GC-MS/MS	Acetonitrila	12-30 mg kg ⁻¹	40-100 mg kg ⁻¹	70-120%	FACCO et al., 2015
Tomate	clorpirifos, diazinon e mais 79 pesticidas.	QuEChERS original	GC-MS	Acetonitrila	0,0025 – 0,0067 mg kg ⁻¹	0,0075 – 0,02 mg kg ⁻¹	72-116%	SALAMZADEH; SHAKOORI; MORADI, 2018.

Amostras aquosas	clorpirifós, diazinon, malation, metil paration e mais 4 pesticidas.	Extração por Ponto Nuvem	LC-UV	POLE e Genapol X-080	0,88-3,54 mg ml ⁻¹	0,03-2,81 mg ml ⁻¹	62,6-84,5 %	SANZ et al., 2018
Suco de frutas	clorpirifós, diazinon, malation, metil paration e mais 5 pesticidas.	Extração por Ponto Nuvem	GC-FPD	PEG 6000	0,0005 – 0,003 mg kg ⁻¹	0,0015 – 0,0090 mg kg ⁻¹	71,6-94,6%	ZHAO et al., 2011
Tomate	clorpirifós, diazinon, e mais 7 pesticidas.	Extração líquido-líquido seguido de SPE	GC-MS	acetona, diclorometano e éter de petróleo	0,0002- 0,005 mg kg ⁻¹	0,012-0,025 mg kg ⁻¹	90,61-103.36%	SAIDI; MOUHOUCHE; ABRI, 2017
Frutas tropicais	diazinon, metil paration e mais 3 agrotóxicos.	MSPD	GC-ECD e GC-MS	acetato de etila	0,005 – 0,025 mg kg ⁻¹	0,05 mg kg ⁻¹	76-105%	FREITAS; SERAFIM; LANÇAS, 2018
Abacaxi	atrazina, clorpirifos, deltametrina, diazinon, malation, metil paration e mais 80 agrotóxicos.	QuEChERS modificado e dSPE	GC-MS/MS	acetato de etila	—	0,01 – 0,05 mg kg ⁻¹	70-120%	DAS et al., 2017
Vegetais, frutas e solo	Fipronil	QuEChERS modificado e dSPE	GC-MS	acetato de etila	—	0,01 mg kg ⁻¹	86-112%	PARAMASIVAM; CHANDRASEKARAN, 2013
Feijão	clorpirifos, fipronil, deltametrina, malation, metil paration e mais 134 agrotóxicos.	QuEChERS	GC-MS/MS	acetonitrila com ácido acético (1%)	—	0,02 – 0,1 mg kg ⁻¹	31-190%	REICHERT et al., 2020
Feijão	atrazina, diazinon, clorpirifos, deltametrina e mais 54 agrotóxicos.	DPX	GC/MS-SIM	Acetonitrila	0,01-0,1 mg kg ⁻¹	---	69,0-120,8%,	LI et al., 2012
Batata	metil paration, clorpirifos, malation e mais 8 agrotóxicos.	SBSE	GC-TSD	Acetona	0,0012- 0,098 ng L ⁻¹	3,0 ng L ⁻¹	93-105%	LIU et al., 2005
Milho e mel	2,4 D, atrazina, metil paration, malation, fipronil, diazinon, deltametrina e clorpirifós	CPE	HPLC/UV	Triton X 100 e Triton X 114	0,0005-0,0008 mg kg ⁻¹	0,005, - 0,008 mg kg ⁻¹	32,6 – 112,9%	ESTE CAPÍTULO

4.6. MÉTODO QUECHERS ORIGINAL E ACETATO

Estudos utilizando o método QuEChERS original estão sendo realizados em larga escala para extração de resíduos de agrotóxicos em alimentos desde sua criação em 2003. Contudo, com o surgimento de novas classes de agrotóxicos o método original apresentou alguns problemas, tais como perda de estabilidade ou recuperação minimizada devido ao pH da amostra. Desde então, surgiram modificações no método, entre as quais, a adição de tampão citrato (PAVÁ et al., 2007) e tampão acetato (LEHOTAY, MAŠTOVSKÁ, LIGHTFIELD, 2005), o que regula o pH da solução entre 4 e 5. Isso aumenta a taxa de recuperação dos agrotóxicos mais sensíveis as variações de pH.

Afim de comparar o método CPE-HPLC/UV proposto com o método QuEChERS original oficializado pela AOAC (Associação de Métodos Oficiais de Análise Química) e o método QuEChERS acetato oficializado pela União Europeia através do Comitê Europeu de Normalização (CEN), realizou-se ensaios de LD, LQ, recuperação e precisão com os mesmos agrotóxicos e matrizes utilizadas anteriormente.

Os valores de LD considerando o método QuEChERS original e o QuEChERS acetato para os agrotóxicos clorpirifós, deltametrina, diazinon e malation foi de 0,006 µg/mL; para o 2,4 D e atrazina foi de 0,008 µg/mL e para o fipronil e o metil paration foi de 0,01 µg/mL. Os limites de quantificação foram de 0,02 µg/mL para clorpirifos, deltametrina, diazinon e malation; 0,05 µg/mL para o fipronil e metil paration e de 0,03 µg/mL para o 2,4 D e atrazina.

Em termos de recuperação obteve-se valores entre 32,7% e 110,6% para o QuEChERS original e entre 23,6% e 119,4% para o QuEChERS acetato considerando as matrizes milho e mel. Esses valores, em sua maioria, encontram-se dentro do critério estabelecido pelos documentos oficiais utilizados para validação do método, os quais consideram uma recuperação ideal para as concentrações analisadas variando entre 70 e 120 % (MAPA, 2017). Os valores de desvio padrão ficaram entre 1,1% e 8,6%, variando de acordo com a concentração e a matriz analisada. Tais valores ficaram dentro do critério estabelecido que considera um desvio padrão relativo menor que 20% (MAPA, 2017). A Tabela 18 apresenta todos os valores de recuperação obtidos com o método QuEChERS original e acetato.

Tabela 18. Taxas de recuperação dos resíduos de agrotóxicos empregando o método QuEChERS original, n=6.

MILHO						
ANALITO	0,1 µg mL⁻¹		0,5 µg mL⁻¹		1,0 µg mL⁻¹	
	R (%)	DPR (%)	R (%)	DPR (%)	R (%)	DPR (%)
2,4 D	57,3	8,6	66,7	4,8	71,8	2,6
ATRAZINA	109,9	7,5	76,1	5,6	78,5	2,4
CLOPIRIFÓS	40,0	5,4	84,6	1,4	88,2	1,9
DELTAMETRINA	69,3	6,6	95,2	2,6	102,3	3,4
DIAZINON	54,8	4,5	76,5	2,7	90,7	5,2
FIPRONIL	54,6	7,0	69,2	2,6	97,3	2,9
MALATION	69,0	8,1	72,4	5,3	73,9	4,8
METIL PARATION	42,5	5,3	55,8	4,7	59,6	3,8
MEL						
2,4 D	76,7	3,8	89,4	2,5	92,7	3,1
ATRAZINA	72,9	5,6	88,4	3,4	99,3	4,2
CLOPIRIFÓS	107,9	6,6	110,6	5,6	108,7	2,1
DELTAMETRINA	59,6	3,5	76,8	4,1	92,6	2,0
DIAZINON	105,6	6,4	102,4	5,2	108,4	3,4
FIPRONIL	82,4	5,5	92,5	2,6	99,6	5,2
MALATION	54,1	7,2	61,1	1,5	65,7	3,3
METIL PARATION	32,7	6,1	66,7	2,7	67,9	2,6

Tabela 19. Taxas de recuperação dos resíduos de agrotóxicos empregando o método QuEChERS modificado (acetato), n=6.

MILHO						
ANALITO	0,1 µg mL⁻¹		0,5 µg mL⁻¹		1,0 µg mL⁻¹	
	R (%)	DPR (%)	R (%)	DPR (%)	R (%)	DPR (%)
2,4 D	97,6	7,6	101,9	5,3	106,7	4,3
ATRAZINA	108,9	6,2	109,4	3,5	105,2	3,4
CLOPIRIFÓS	23,6	5,1	66,3	4,7	72,4	5,2
DELTAMETRINA	80,7	6,7	88,5	3,5	104,6	2,6
DIAZINON	91,9	5,4	107,9	2,9	104,5	3,7
FIPRONIL	61,8	4,4	74,6	5,1	96,4	1,9
MALATION	74,7	3,2	105,7	6,7	92,4	3,8
METIL PARATION	60,5	5,8	66,3	4,9	81,2	2,9
MEL						
2,4 D	78,2	6,4	79,3	5,4	93,4	2,3
ATRAZINA	80,5	5,1	95,6	3,6	104,9	2,1
CLOPIRIFÓS	69,8	6,9	75,5	3,3	79,1	1,1
DELTAMETRINA	41,1	5,7	61,7	2,6	78,3	5,4
DIAZINON	102,7	3,2	107,6	1,7	109,4	6,0
FIPRONIL	107,2	2,8	102,6	4,3	106,7	3,9
MALATION	86,6	5,4	99,7	4,9	105,2	4,7
METIL PARATION	69,4	3,9	87,1	5,6	92,6	4,2

Ao comparar os resultados de recuperação obtidos pelo método QuEChERS, observa-se um melhor desempenho do método QuEChERS-acetato nos critérios de exatidão e precisão em relação ao método original. Os agrotóxicos atrazina, malation e metil paration apresentaram resultados de recuperação abaixo da faixa estabelecida nas diferentes concentrações (MAPA, 2017). Isso pode ocorrer por inúmeros fatores, destacando-se a competição entre os analitos e outros compostos presentes na matriz, assim como pelo coeficiente de partição octanol/água de alguns agrotóxicos serem menores em relação aos outros. O malation, por exemplo, apresenta o menor valor de coeficiente entre todos (2,36) enquanto a deltametrina apresenta o maior valor (6,2) (PUBCHEM, 2019). Baixos valores de coeficiente de partição octanol/água indicam maior polaridade de alguns agrotóxicos e maior tendência desse analito permanecer na fase aquosa não sendo particionado para a fase orgânica (acetonitrila). Apesar da adição de sais durante a etapa de extração e limpeza utilizando o método QuEChERS reduzir a fase aquosa, pouco favoreceu a recuperação de alguns agrotóxicos (PRESTES et. al, 2009). Os demais agrotóxicos apresentaram resultados de extração satisfatórios estando dentro da faixa estabelecida que é de 70 a 120% (MAPA, 2017).

4.7. COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS PELO MÉTODO QUECHERS ORIGINAL E ACETATO E O MÉTODO CPE-HPLC/UV PROPOSTO.

A busca por métodos eficientes, baratos e de fácil execução para análises de agrotóxicos em alimentos tem se intensificado nos últimos anos. Quando se comparou o método CPE-HPLC/UV proposto neste trabalho com os métodos oficiais QuEChERS original e acetato observa-se que os resultados de recuperação, em sua maioria, apresentaram valores dentro da faixa estabelecida entre 70 e 120 %. Esses valores estão em acordo com os protocolos de validação de métodos de determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos utilizados durante as análises. Outra observação importante está nos valores de LD e LQ para os métodos utilizados, sendo que o método CPE-HPLC/UV apresentou valores menores em relação aos apresentados pelo QuEChERS, mostrando ser um método passível de utilização.

Em comparação com o método QuEChERS, a extração por Ponto Nuvem mostrou ser um procedimento mais simples, com baixo consumo de reagentes de alta periculosidade e menor custo. O uso de surfactante no método CPE proporcionou uma limpeza da matriz tão boa quanto aquela proporcionada pelo uso do PSA no método QuEChERS minimizando os

ruídos ocasionados pela presença de interferentes na linha de base nas análises por HPLC/UV. Outro ponto fundamental é em relação a pré-concentração proporcionada pelo método CPE, fato não observado no método QuEChERS, gerando maior sensibilidade possibilitando a análise de resíduos de agrotóxicos em matrizes alimentícias por HPLC acoplado a um detector menos sensível como o UV.

4.8. APLICAÇÃO DO MÉTODO CPE-HPLC/UV PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE MILHO E MEL.

Após validação do método proposto, duas amostras de cada alimento (milho e mel) foram analisadas em triplicata seguindo os métodos propostos. As amostras foram obtidas em comércios e feiras locais da cidade de Catalão-GO. As amostras de milho foram trituradas (2,0 kg) e armazenadas em recipientes com temperatura inferior a 4°C para posterior análise. As amostras de mel foram mantidas em recipientes de plástico em temperatura ambiente.

Para análise das amostras curvas analíticas foram construídas em matriz e nas amostras de cada alimento fortificada com os agrotóxicos na concentração 0,05 µg mL⁻¹, para verificar a conformidade da curva analítica. As amostras fortificadas apresentaram valores de recuperação entre 72,9 e 103,5 % para todos os agrotóxicos, empregando o método CPE-HPLC/UV, exceto para o 2,4 D que apresentou recuperação de 59,2%. A Tabela 20 apresenta os resultados das análises das amostras submetidas ao método CPE-HPLC/UV.

Tabela 20: Amostras analisadas pelo método proposto quanto a presença e concentração de oito agrotóxicos normalmente empregados na região de Catalão-GO.

COMPOSTO	MILHO				MEL			
	Amostra 01		Amostra 02		Amostra 01		Amostra 02	
	TX-100	TX-114	TX-100	TX-114	TX-100	TX-114	TX-100	TX-114
2,4 D	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
ATRAZINA	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
CLORPIRIFÓS	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
DELTAMETRINA	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	0,01mg kg ⁻¹	0,008 mg kg ⁻¹
DIAZINON	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
FIPRONIL	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LD	< LD	0,008 mg kg ⁻¹	0,006 mg kg ⁻¹
MALATION	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
METIL PARATION	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD

LQ – Menor que o limite de quantificação do método proposto; < LD – Menor que o limite de detecção do método proposto.

Ao submeter as amostras estudadas ao método CPE-HPLC/UV detectou-se resíduos dos agrotóxicos deltametrina e fipronil apenas em uma das amostras de mel. As demais

amostras não apresentaram resultados referentes a resíduos dos agrotóxicos estudados acima do LD ou os valores de concentração observados encontravam-se abaixo do valor de LQ não sendo considerado para quantificação. Em relação aos resíduos observados apenas o fipronil, quando se utiliza o surfactante TX-114, apresentou resultado acima do limite máximo residual permitido pela União Europeia, porém a legislação brasileira não apresenta LRM para fipronil em mel. É importante mencionar que o fipronil e a deltametrina são agrotóxicos amplamente utilizados em plantações da região. O fipronil tem larga aplicação em culturas de soja e tratamento do solo na cultura de milho e a deltametrina é utilizada em culturas de milho, tomate e verduras folhosas. Todos esses alimentos são cultivados na região e comercializados em feiras e comércios da cidade.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste capítulo demonstram que a metodologia proposta utilizando o método de extração por ponto nuvem (CPE) é simples, rápido e de baixo custo. Além disso, o método proposto necessita de poucas etapas analíticas, reduzindo, então, o tempo de execução. Ao comparar os resultados obtidos utilizando o método de extração por ponto nuvem com o método padrão QuEChERS ambos demonstram ser eficientes, com recuperações na faixa de 70 a 120 % e desvio padrão relativo menor que 20% para os agrotóxicos em estudo, estando, portanto, de acordo com os critérios de validação de metodologia analítica proposta no protocolo de validação de métodos de determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos definido pela Comunidade Europeia – documento SANTE/11813/2017 (SANTE, 2017). Além disso, o método CPE apresentou aumento na sensibilidade com limite de detecção e quantificação suficientes para determinar os agrotóxicos em alimentos, assim como valores de precisão e exatidão aceitáveis.

As vantagens do método CPE otimizado neste capítulo frente ao método de extração oficial QuEChERS são menor consumo de reagentes e conseqüentemente menor produção de resíduos, baixo custo e fácil execução. Logo, conclui-se que os métodos de extração propostos nesse capítulo são adequados para a determinação dos resíduos dos agrotóxicos em estudo nas amostras de alimentos, apresentando parâmetros analíticos de validação da metodologia proposta dentro dos limites exigidos nos principais protocolos recomendados pelas agências internacionais e nacionais de regulamentação.

**DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE METIL PARATION EM MEL
UTILIZANDO ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM
BORO APÓS EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM**

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas é perceptível o aumento do consumo de mel para diferentes finalidades. Além de ser apreciado pelo sabor e valor nutricional, o mel possui propriedades antissépticas e antimicrobianas, podendo ser utilizado como conservante de frutas e grãos. No entanto, pesticidas e acaricidas podem ser usados para controlar pragas de colmeias e doenças das abelhas, o que leva à contaminação direta do mel por esses produtos químicos.

Em uma determinação típica de compostos orgânicos ou inorgânicos em matrizes complexas, como amostras de mel, o pré-tratamento da amostra é uma etapa crucial dentro dos procedimentos analíticos para que a extração dos analitos de interesse seja realizada de forma eficiente com uma interferência mínima da matriz (YU et al., 2018; ZHANG et al., 2020).

Portanto, diferentes técnicas de extração aplicadas a agrotóxicos têm sido utilizadas na preparação de amostras de alimentos, entre as quais destaca-se a extração em fase sólida (SPE), extração líquido-líquido (LLE), extração assistida por ultrassom (UAE), extração em fase sólida dispersiva (dSPE) (ZHANG et al., 2014; ZENG et al., 2016; VASILESCU; MARTY, 2016; AZZOUZ et al., 2019; SOCAS-RODRÍGUEZ et al., 2017) e a extração por ponto de nuvem (CPE), a qual tem sido utilizada para extrair uma variedade de compostos orgânicos ou inorgânicos em diferentes matrizes através da adição de surfactantes (KASA et al., 2019).

Em relação a detecção de agrotóxicos as técnicas eletroanalíticas oferecem vantagens importantes como baixos limites de detecção, análise rápida, seletividade adequada, instrumentação de baixo custo, possibilidade de automação e uso de dispositivos portáteis para análise (ZENG et al., 2016; BEITOLLAHI et al., 2020). Diversas técnicas eletroquímicas tem sido utilizadas na quantificação do metil paration (analito de interesse nesse capítulo) em amostras variadas, destacando-se a amperometria (AMP) (GOVINDASAMY et al., 2017; XUE et al., 2012; TUNESI et al., 2018; STOYTCHIEVA et al., 2014), voltametria cíclica (CV) (XUE et al., 2014; GONG, WANG, ZHANG, 2009; WANG et al., 2018; KUMAR, D'SOUZA, 2011), voltametria de pulso diferencial (DPV)

(WANG et al, 2019; SINGH et al., 2019; GAO et al., 2019; JIN, LIU, WEI, 2013; MANAVALAN et al., 2020; TSIAFOULIS, NANOS, 2010), voltametria adsorptiva de redissolução por pulso diferencial (DPAdSV) (ZENG et al., 2012), voltametria de decapagem catódica de pulso diferencial (DPCSV) (OLIVEIRA et al., 2017) e voltametria de onda quadrada (SWV) (KUMAR, SUNDRAMOORTHY, 2019; PARHAM, RAHBAR, 2010). Além disso, diferentes tipos de amostras, como frutas (WANG et al., 2018; MANAVALAN et al., 2020), amostras de água (XUE et al., 2014; STOYTCHIEVA et al., 2014; GAO et al., 2019; ZENG et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2017; PARHAM, RAHBAR, 2010), sucos (KHAIRY, AYOUB, BANKS, 2018; JIN, LIU, WEI, 2013), vegetais (GOVINDASAMY et al., 2017; XUE et al., 2012; TUNESI et al., 2018; WANG et al., 2019; MANAVALAN et al., 2020), solo (SINGH et al., 2019) e urina (KHAIRY, AYOUB, BANKS, 2018) têm sido utilizados na determinação de metil paration por meio de técnicas eletroquímicas.

Jin et al. (2013), relataram o uso de eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) modificado com fibra de Au/quitosana para a detecção de metil paration em amostras de suco de maçã utilizando a voltametria de pulso diferencial em solução tampão fosfato (PBS, pH 5,9). Os autores obtiveram um limite de detecção (LD) de 800 nmol L^{-1} com recuperações de 93,3 a 97,5%.

Considerando métodos eletroquímicos, até o momento, um único trabalho na literatura abordou a determinação de metil paration em amostras de mel usando detecção eletroquímica (TSIAFOULIS, NANOS, 2010). Os autores extraíram amostras de mel fortificadas com metil paration usando uma mistura de acetona e solução tampão Britton-Robinson (BR) (pH = 7), em seguida, a eletroanálise dos extratos foi realizada por voltametria de redissolução adsorptiva por pulso diferencial (AdsDPV) em um eletrodo de trabalho de mercúrio suspenso (HME). O LD obtido foi de 196 nmol L^{-1} com recuperação de 101,3%. No entanto, devido à toxicidade do mercúrio, os eletrodos de trabalho à base de carbono são mais recomendados. Entre estes, eletrodos de diamante dopados com boro (BDD) têm sido amplamente utilizados para a determinação de muitos compostos eletroativos.

Em relação ao uso de técnicas eletroquímicas associadas a extração por ponto nuvem observou-se apenas um trabalho que apresenta a extração e pré-concentração de cádmio em amostras de água da torneira e do rio por CPE para posterior determinação de metal (cádmio) por voltametria de redissolução anódica (ASV) usando um eletrodo de carbono vítreo revestido de mercúrio (Hg-GC) (RUSINEK et al., 2015).

Este capítulo apresenta uma metodologia ecologicamente correta para determinação sensível e seletiva de metil paration em amostras de mel, combinando a técnica de extração por ponto de nuvem (CPE) com detecção voltamétrica de onda quadrada (SWV) em uma pré-concentração catódica utilizando eletrodo dopado com boro (H-BDD).

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Desenvolver um método eletroanalítico para determinação de metil paration em amostras de mel, consistindo na combinação da técnica de extração por ponto nuvem na etapa de preparação de amostras em conjunto com detecção por voltametria de onda quadrada utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro (H-DDB) como eletrodo de trabalho.

2.2. ESPECÍFICO

- ❖ Otimizar os parâmetros que influenciam na extração por ponto nuvem através de planejamento fatorial;
- ❖ Realizar medições eletroquímicas utilizando voltametria de onda quadrada (potencial de ativação, frequência, amplitude e o incremento de potencial) para quantificação de metil paration em amostras de mel;
- ❖ Validar a metodologia desenvolvida;
- ❖ Aplicar o método desenvolvido em amostras de mel comercializadas na cidade de Catalão-GO.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. INSTRUMENTAÇÃO, CÉLULA ELETROQUÍMICA E ELETRODOS

As medidas de voltametria cíclica (CV) e voltametria de onda quadrada (SWV) foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato portátil pocketSTATtm (Ivium, Eindhoven, Países Baixos) acoplado a um laptop via conexão USB. O software IviumSoft para Windows 10[®] foi utilizado para o controle do instrumento.

Um fio de platina, um eletrodo de Ag/AgCl/KCl_{sat} e um eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) foram utilizados como eletrodos auxiliares, de referência e de trabalho, respectivamente. Uma pequena placa (7 × 7 mm com uma espessura de 1,0 mm) de um filme fino de diamante dopado com boro com nível de dopagem de boro de aproximadamente 8000

ppm depositado em uma pastilha de silicone condutora, adquirido da NeoCoat SA (La Chaux-de-Fonds, Suíça).

O DDB foi submetido a uma ativação eletroquímica em meio ácido ($0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$) apenas uma vez antes do início dos experimentos, conforme descrito em trabalhos anteriores (KUZMANOVIĆ et al, 2016; STANKOVIĆ, KALCHER, 2016), sendo utilizado durante o desenvolvimento de todo o trabalho: primeiro, + 2,0 V foi aplicado no DDB por 300 s (tratamento anódico) seguido pela aplicação de -2,0 V por 300 s (ativação catódica). A sequência (anódica seguida de catódica) tem sido recomendada por gerar melhores respostas e auxiliar na reprodutibilidade das medidas eletroquímicas (SUFFREDINI et. al, 2004; SALAZAR-BANDA et al., 2006).

As medições eletroquímicas foram realizadas utilizando uma célula de polipropileno com volume interno de aproximadamente 10,0 mL. O eletrodo DDB foi acoplado ao fundo da célula em uma placa de aço inoxidável (para contato elétrico). Um O-ring de borracha delimitou a área do eletrodo DDB ($0,2 \text{ cm}^2$) evitando possíveis vazamentos. A fixação do eletrodo, O-ring e placa na célula foi realizada através de parafusos que pressionavam a placa de metal contra o eletrodo. Os eletrodos auxiliares e de referência foram fixados na parte superior da célula (KUZMANOVIĆ et al., 2016). Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas à temperatura ambiente e após uma purga de nitrogênio por 5 minutos para a remoção do oxigênio dissolvido.

3.2. REAGENTES E AMOSTRAS

Todas as soluções aquosas utilizadas foram preparadas com água desionizada (resistividade maior que $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtida de um sistema de purificação de água Millipore Direct-Q3 (Bedford, MA, EUA). As soluções tampão Britton-Robinson (BR) foram preparadas utilizando ácido acético (99,7% m/v) obtido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), ácido fosfórico (85,0 % m/v) e ácido bórico obtidos da AppliChem (Darmstadt, Alemanha) e hidróxido de sódio (98,0 % m/m) da Synth (São Paulo, Brasil). As soluções tampão BR (pH 2,0 - 10,0) foram preparadas com uma mistura de $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de soluções de ácido acético, bórico e fosfórico, com ajuste de pH com solução de hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. O tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 4,7) foi preparado com solução de ácido acético e o pH ajustado com solução de hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

As soluções de Triton X-110 (TX-110) (Sigma Aldrich, St Louis, EUA) utilizadas no trabalho foram preparadas em água desionizada. Utilizou-se também metanol (99,9% v/v) da JTBaker (San Pedro Xalostoc, México), acetonitrila (99,9% v/v) da Tedia (Fairfield, EUA) e cloreto de sódio (99,8% m/m) da Synth (Diadema, São Paulo, Brasil). Foi adquirido o padrão de grau analítico de metil paration (> 98% m/m) da Sigma Aldrich (St Louis, EUA). A solução estoque de MP foi preparada em acetonitrila a uma concentração de 1 mmol L⁻¹, sendo diluída, posteriormente, para 100 μmol L⁻¹ em solução tampão BR para medições eletroquímicas.

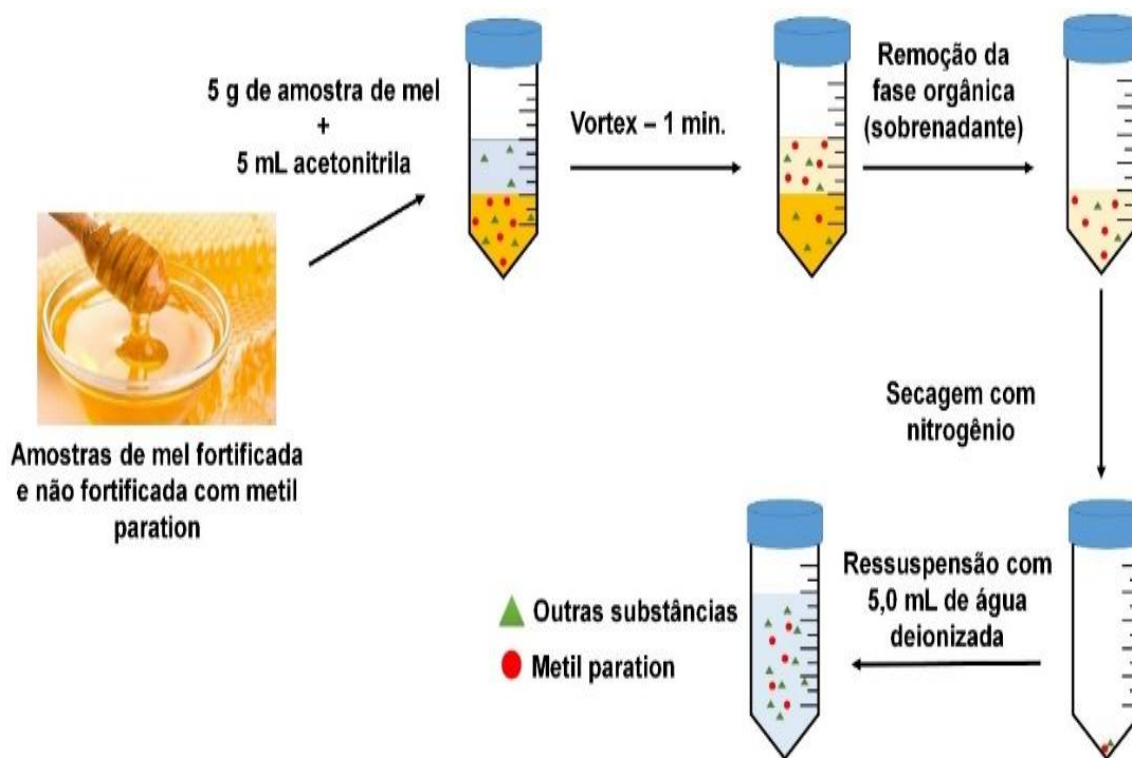
3.3. MEDIÇÕES ELETROQUÍMICAS

A técnica de voltametria cíclica (CV) foi utilizada para a investigação do comportamento eletroquímico do metil paration no eletrodo de trabalho BDD para posterior determinação do metil paration em amostras de mel. A otimização dos parâmetros de voltametria de onda quadrada foi realizada por experimentos univariados na presença de 5,0 μmol L⁻¹ de metil paration em tampão Britton-Robinson (BR) 0,1 mol L⁻¹ com pH 6,0. Os parâmetros avaliados foram: frequência (10 a 100 Hz), degrau de potencial (1 a 10 mV) e amplitude de potencial (10 a 100 mV). Antes de cada varredura SWV (de -0,5 a -0,9 V), um potencial de limpeza (+2,0 V por 15 s) seguido de um potencial de reativação (-2,0 V por 15 s) foi aplicado ao DDB com o eletrólito sob agitação, para a remoção de produtos de adsorção da superfície do eletrodo e para executar uma nova ativação catódica in situ.

3.4. PREPARAÇÃO DE AMOSTRA

Para avaliar a aplicabilidade do método proposto, duas amostras de mel foram obtidas diretamente de produtores da região de Catalão - Goiás (Brasil). As colmeias das quais o mel foi retirado estavam localizadas perto de áreas de cultivo de soja e milho que são frequentemente pulverizadas com metil paration. As amostras foram armazenadas em recipientes de plástico de 1,0 L, mantidas em temperatura ambiente e analisadas anteriormente a 30 dias. A Figura 1 mostra um esquema de extração de metil paration em amostras de mel com e sem fortificação.

Figura 1: Esquema de preparação das amostras de mel fortificadas e não fortificadas com metil paration.



Para aplicação da técnica de CPE é necessário que a amostra se encontre no estado líquido. Portanto aplicou-se uma técnica de extração do metil paration presente no mel utilizando um solvente e, posteriormente, aplicou-se a etapa de CPE. O procedimento para a preparação da amostra consistiu em pesar 5,0 g de uma amostra de mel (com ou sem metil paration) em tubo cônico do tipo Falcon com volume de 50 mL. A amostra foi aquecida em banho-maria a 40°C por 1 minuto para melhor homogeneização. Em seguida, foram adicionados 5,0 mL de acetonitrila e o tubo foi agitado por 1 minuto em vortéx. A mistura foi deixada em repouso por 15 minutos e o sobrenadante foi removido e secado em um fluxo de nitrogênio com ressuspensão em 5,0 mL de água desionizada.

3.5. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM

Após otimização das condições necessárias para identificação do metil paration no sistema eletroquímico, iniciou-se a avaliação dos fatores que influenciam no processo de extração por ponto nuvem: concentração do surfactante (Triton X-100), concentração de eletrólito (NaCl) e tempo de aquecimento. Para realizar a otimização optou-se pela aplicação

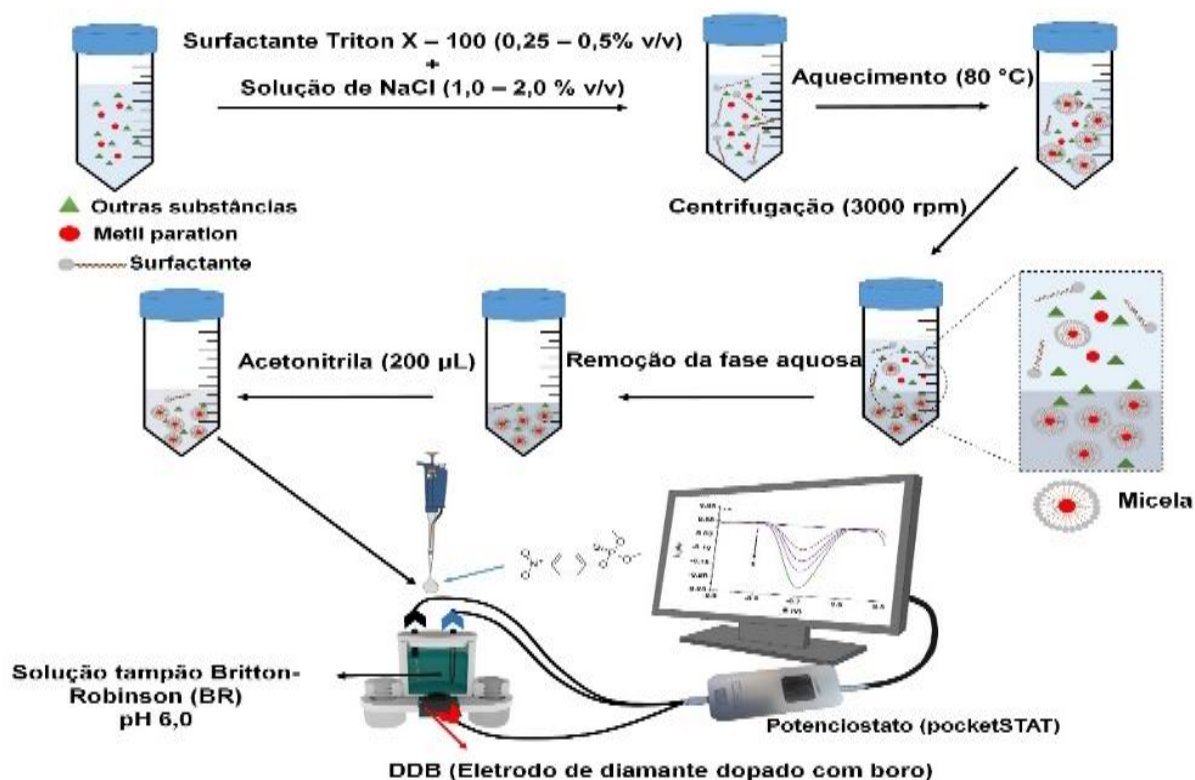
do planejamento fatorial completo de composto central com dois níveis e três variáveis, 2^3 (com dois pontos centrais). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Análise de variância (ANOVA) e o nível de significância dos valores, ($p > 0,05$), foram utilizados para análise dos efeitos obtidos. O desvio padrão, o coeficiente e outros parâmetros estatísticos foram observados para os modelos ajustados.

Para cada experimento de otimização do método de extração por ponto nuvem, utilizou-se um tubo cônico graduado do tipo Falcon com volume de 15,0 mL contendo: 5,0 mL de matriz extraída fortificada com $1,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ de metil paration, 2,0 mL de solução de surfactante Triton X-100 (concentração nominal de 0,25 - 0,5% m/v) e 1,0 mL de solução de NaCl (concentração nominal de 1,0 - 2,0%, m/v). O volume do tubo foi completado para 10,0 mL com água desionizada.

A mistura foi aquecida em banho-maria a 70°C por um tempo especificado (30 - 60 min) para obtenção do ponto nuvem e consequente extração. Duas fases foram formadas, uma fase orgânica contendo surfactante e o metil paration extraído e uma fase aquosa. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 8000 rpm por 10 minutos para acelerar a separação de fases.

Após remoção da fase aquosa, 200 μL de acetonitrila foram adicionados à fase rica em surfactante contendo o metil paration (Figura 2). Essa adição visa ajudar a diminuir a viscosidade da mistura, dissolver as moléculas de Triton X-100 e quebrar as micelas formadas durante o procedimento de extração do ponto de nuvem (RUSINEK et al, 2015; SARIDAL, ULUSOY, 2019). Dessa forma, o metil paration é removido do interior das micelas, onde fica livre para interagir com a superfície do eletrodo durante as leituras de SWV, proporcionando uma melhor sensibilidade (RUSINEK et al., 2015). O uso direto da fase orgânica na célula eletroquímica sem a adição de um solvente proporciona o isolamento do metil paration dentro da micela e, o que poderia gerar correntes de pico mais baixas e potenciais de pico deslocados (RUSINEK et al., 2015). Etanol e metanol também foram avaliados, mas a solubilidade da fase orgânica foi comprometida e apresentou aspecto turvo e viscoso, impróprio para leituras eletroquímicas. Assim, a acetonitrila foi escolhida como solvente a ser adicionado. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Figura 2: Esquema de Extração por Ponto Nuvem e determinação eletroquímica.



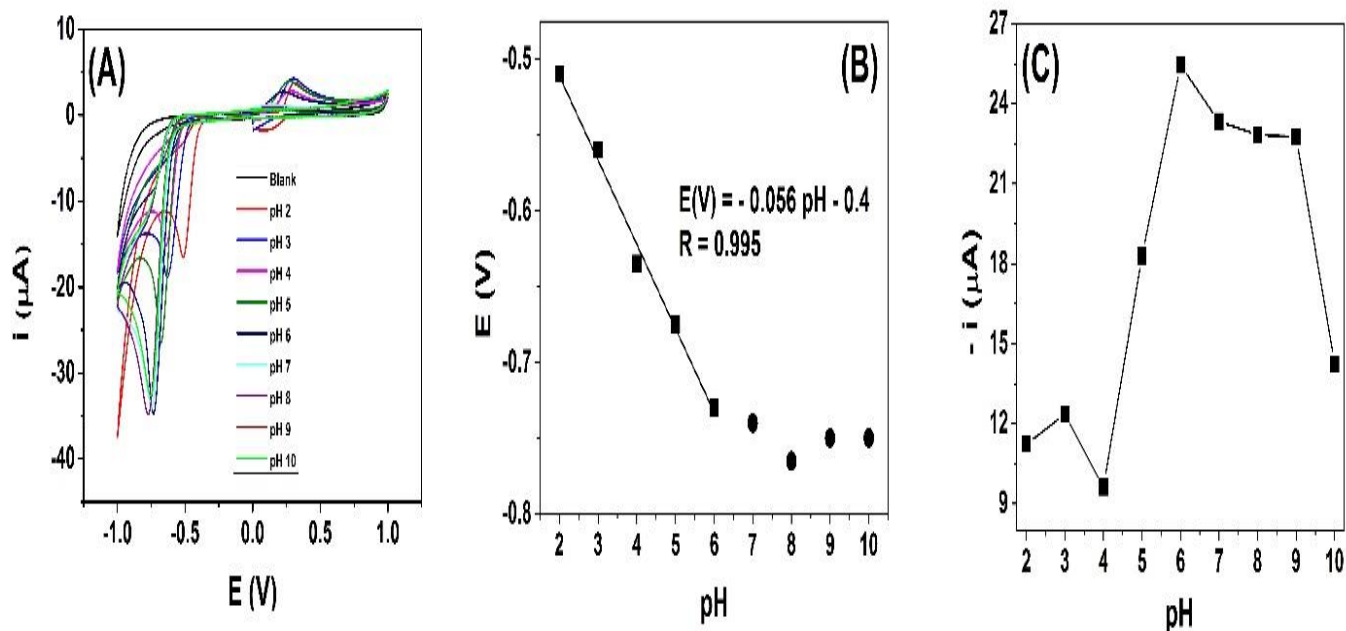
Após otimização do método de extração realizou-se estudo de recuperação em que se aplicou a matriz extraída do mel fortificada em três níveis de concentração (0,25, 0,5 e 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) o procedimento de extração por ponto nuvem. A fase orgânica extraída por CPE foi adicionada no eletrólito contido na célula eletroquímica ocorrendo uma diluição de 25 vezes (0,2 mL de fase orgânica em 4,8 mL de solução tampão BR). A análise ocorreu pelo método de adição padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO ELETROANALÍTICO PARA A ANÁLISE DE METIL PARATION

O comportamento eletroquímico do metil paration foi investigado através de voltametria cíclica em solução tampão BR (pH de 2,0 a 10,0) na faixa de potencial entre -1,0 e +1,0 V (Figura 3).

Figura 3: (A) Voltamogramas cíclicos do metil paration ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) em soluções tampão BR (faixa de pH 2,0 a 10,0). (B) Gráfico da dependência de E (V) vs. pH e inclinação da equação de regressão linear. (C) Gráfico da dependência de $i(\mu\text{A})$ vs. pH. Taxa de varredura = 50 mVs^{-1} .



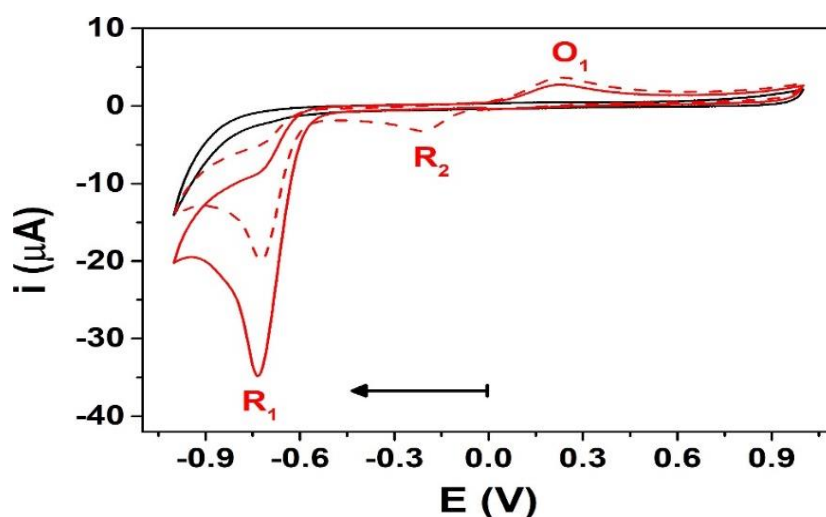
Observa-se que o tampão Britton-Robinson pH 6,0 proporcionou a maior resposta eletroquímica na redução de metil paration e, portanto, este eletrólito foi selecionado para a continuação dos experimentos. Outros eletrólitos de suporte (tampão acetato e fosfato) não forneceram respostas satisfatórias (sinais de baixa corrente) e foram descartados.

A Figura 4 mostra o primeiro e o segundo voltamogramas cíclicos obtidos na presença de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de metil paration em tampão BR pH 6. Na primeira varredura (começando em 0,0 V na direção catódica) foi observado um grande pico de redução (R1) em torno de -0,70 V, correspondendo à redução do grupo nitro (MP-NO₂) em hidroxilamina (MP-NHOH) em uma transferência envolvendo 4 elétrons e 4 prótons (reação 1 do esquema 1) (GAO et al, 2019).

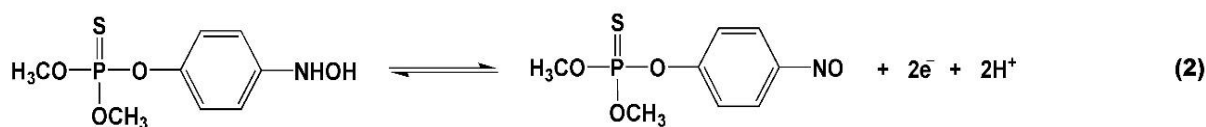
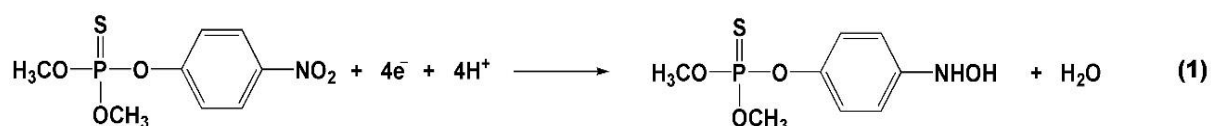
Durante a varredura reversa (anódica), foi observado um pico de oxidação menor em torno de + 0,3 V (O1), atribuído à conversão do grupo hidroxilamina (MP – NHOH) em outro grupo nitroso (MP – NO), envolvendo dois prótons e dois elétrons (reação 2 do esquema 1). Essa reação gera um pico de redução (um par redox) em - 0,2 V (R2) na segunda varredura, envolvendo também dois prótons e dois elétrons (reação 2 do esquema 1) (GAO et al, 2019). As reações eletroquímicas envolvidas neste mecanismo são mostradas no Esquema 1. Apenas

o primeiro pico catódico (R1) foi investigado nos estudos posteriores, uma vez que apresentou a maior corrente de pico em comparação com outros processos faradáicos.

Figura 4. Voltamogramas cíclicos obtidos na ausência (linha preta) e na presença de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de metil paration com a primeira varredura (linha vermelha sólida) e a segunda varredura (linha vermelha tracejada). Taxa de varredura: 50 mV s^{-1} . Eletrólito de suporte: tampão Britton-Robinson (BR) pH 6,0.



Esquema 1: Reação eletroquímica do metil paration na superfície do eletrodo DDB (YUE et al., 2016).

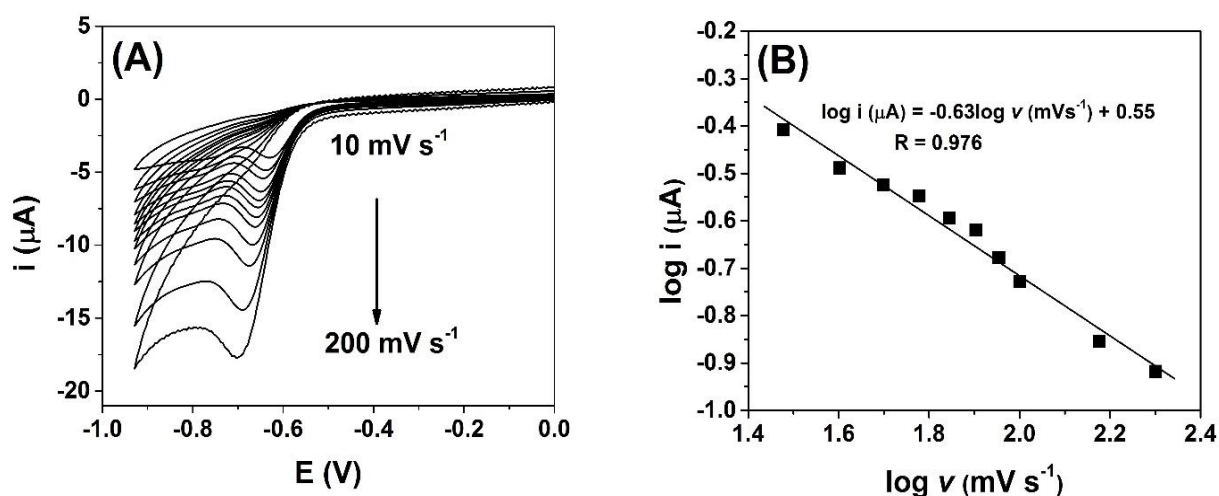


De acordo com a Figura 3B, o potencial de pico de R1 (Figura 4) mudou negativamente com o aumento do pH, mostrando uma dependência linear de pH 2,0 a 6,0 (próximo ao pKa do metil paration = 6,8). A inclinação da equação de regressão linear foi de $-0,056 \text{ V pH}^{-1}$, um valor próximo quando comparado ao nernstiano ($-0,059 \text{ V pH}^{-1}$). Assim, o mesmo número de elétrons e prótons envolvido nesse processo de redução, está de acordo com a literatura (4 prótons e 4 elétrons) (GAO et al, 2019; GOVINDASAMY et al., 2017; FU et al.,

2016; SONG, CAO, WANG, 2016; SINGH et al., 2019; GAO et al, 2019; GARBELLINI et al., 2009; PEDROSA et al. 2006; TCHEUMI et al., 2010; CARDOSO, VALLE, CODOGNOTO, 2018; GERENT; SPINELLI, 2016). A partir deste estudo, o tampão BR pH 6,0 foi escolhido devido as correntes de pico mais altas para metil paration (Fig. 3C). Além disso, apenas o pico de redução de metil paration em -0,73 V (R1) foi monitorado nos experimentos subsequentes devido ao pico mais alto em comparação com outros processos faradaicos.

O efeito da velocidade de varredura nas respostas voltamétricas cíclicas também foi estudado na faixa de 10 - 200 mV s^{-1} (Fig. 5). O pico de redução (R1) tornou-se mais intenso com o aumento da velocidade de varredura e ligeiramente alterado para valores mais negativos, uma característica típica de uma reação eletroquímica irreversível (Figura 5A) (PEDROSA et al., 2006; GERENT, SPINELLI, 2016).

Figura 5: (A) Voltamogramas cíclicos de metil parathion ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$) em H-BDDE em diferentes velocidades de varredura (10 a 200 mV s^{-1}). (B) Gráfico da dependência de $\log i$ vs. $\log v$ e respectiva equação de regressão linear. Eletrólito de suporte: tampão BR pH 6.

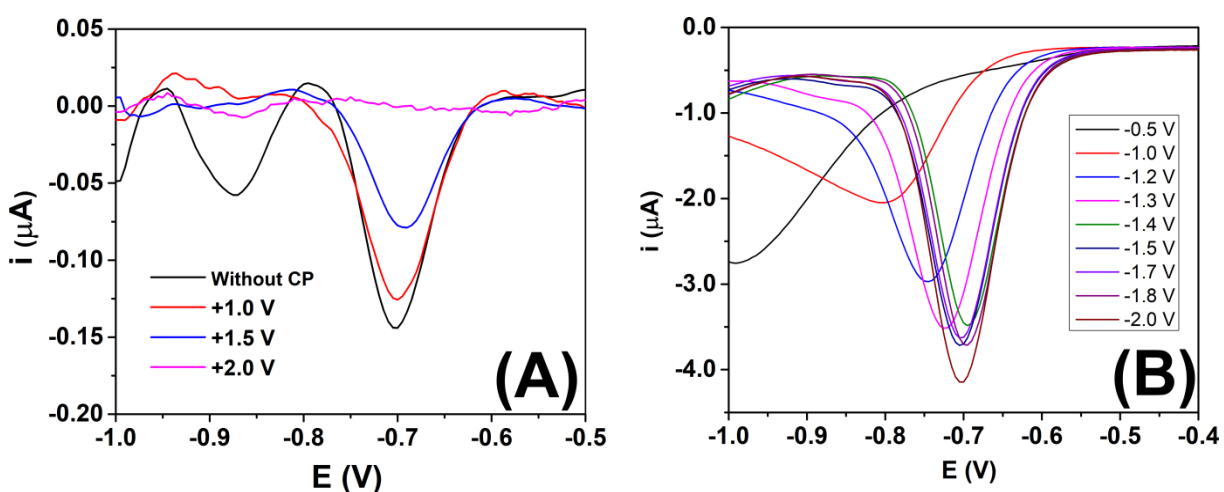


Para os estudos analíticos, foi escolhida a voltametria de onda quadrada (SWV), pois apresenta maior sensibilidade e velocidades de varredura mais rápidas que a técnica de voltametria cíclica. As primeiras medições por SWV foram realizadas com $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de metil paration em tampão BR pH 6. No entanto, foram notados sinais de corrente crescentes entre as medições da mesma solução, sugerindo um efeito de memória entre as varreduras sucessivas.

Um trabalho anterior mostrou o efeito de adsorção de metil paration na superfície do eletrodo, causando perda de reprodutibilidade do sinal analítico durante medições subsequentes (GARPELLINI, SALAZAR-BANDA, AVACA, 2009). Assim, investigou-se a aplicação de um potencial prévio de condicionamento anódico (limpeza) para oxidação de metil paration residual (e renovação da superfície do DDB), mantendo a solução sob agitação (2000 rpm).

A Figura 6A mostra os registros SWV de uma solução em branco medida após a varredura de uma solução de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de metil paration sem e com um potencial de condicionamento (+1,0, +1,5 e +2,0 V) durante 15 s. Se nenhum potencial de condicionamento for aplicado ao DDB, observa-se, então picos catódicos residuais do metil paration adsorvido (Fig. 6A). Entretanto, os picos de metil paration residual diminuem proporcionalmente em função do potencial aplicado, sem sinais residuais utilizando um valor de +2,0 V. Assim, o potencial de condicionamento de +2,0 V (por 30 s) tem um efeito de limpeza eficaz, sendo utilizado nas medições posteriores.

Figura 6: (A) Figura do branco de SWV em tampão BR pH 6 (após varredura de metil paration na concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) sem e após aplicar potenciais de condicionamento (+1,0 a +2,0 V) em BDDE. (B) Curvas SWV na presença de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de metil paration e tampão BR pH 6 após aplicação do potencial de ativação (-0,5 V a -2,0 V) em BDDE. Condições SWV: Frequência: 30 Hz; Amplitude: 50 mV; Incremento de potencial: 7 mV; Potencial de condicionamento (B): +2,0 V (por 15 s); Taxa de agitação: 2000 rpm.

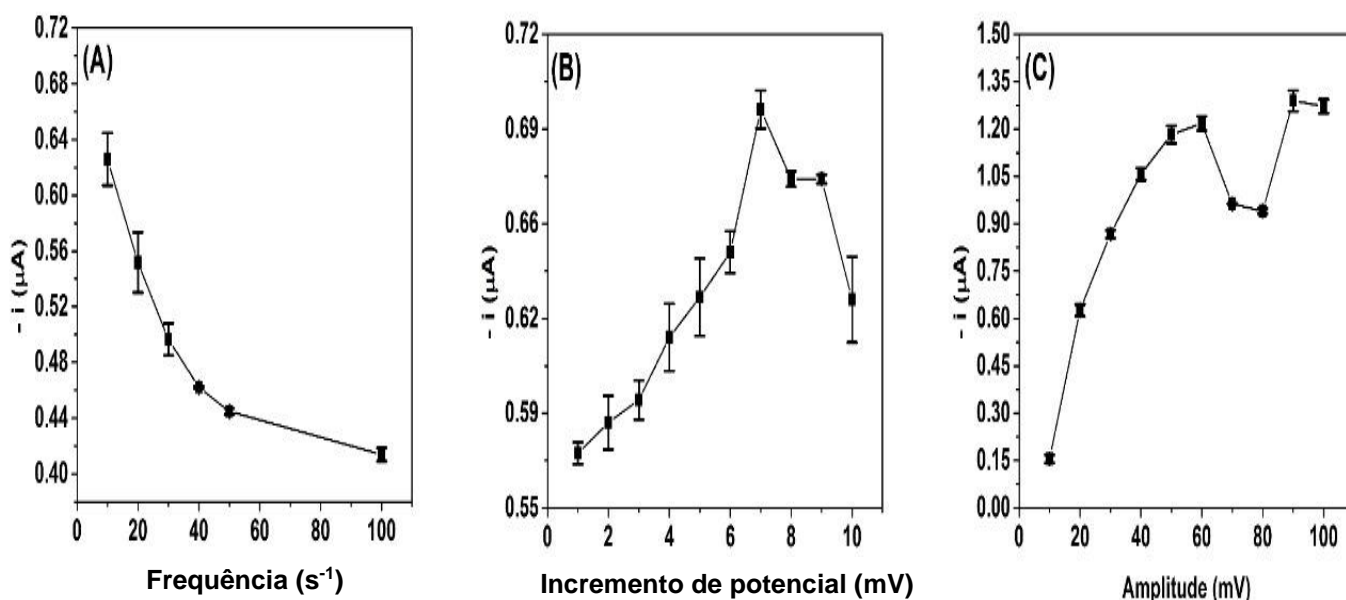


No entanto, além do efeito de limpeza, o potencial aplicado de +2,0 V pode regenerar uma superfície DDB oxigenada (ativação anódica), o que diminuiu consideravelmente os

picos de metil paration. Assim, foi investigada a aplicação de um segundo potencial (de ativação catódica), a fim de regenerar a superfície do H-DDB entre cada medição. Conforme apresentado na Figura 6B, quando o potencial de ativação foi alterado de $-0,5$ para $-2,0$ V, a corrente de pico aumentou e o potencial de pico do MP mudou para potenciais próximos de $-0,7$ V (valor esperado para metil paration no H-DDB (Figura 3)). O tempo de ativação foi avaliado de 0 a 180 s, no qual a melhor corrente e precisão foram obtidas com 15 s. Assim, essa etapa de condicionamento (potencial de limpeza de $+2,0$ V/15 s, seguida de potencial de ativação de $-2,0$ V/15 s) foi utilizada nos demais experimentos. De fato, a reprodutibilidade foi consideravelmente melhorada quando comparamos o DPR com e sem essa etapa de condicionamento (4%, vs 12% respectivamente, $n = 4$).

Os parâmetros de voltametria de onda quadrada também foram investigados (Figura 7). Como observado na Figura 7 uma frequência de 30 Hz, um incremento de potencial de 7 mV e amplitude de 50 mV apresentaram a melhor relação entre resolução, intensidade de corrente e precisão, sendo escolhidos para os próximos experimentos.

Figura 7:Variação das correntes de pico (\pm SD, $n= 3$) das curvas de SWV medidas na presença de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de metil paration e tampão BR pH 6 em função da frequência (A), passo (B) e amplitude (C). Potencial de limpeza: $+2,0$ V (por 15 s), Potencial de ativação: $-2,0$ V (por 15 s); Tempo de equilíbrio: 15 s; Velocidade de agitação: 2000 rpm.



Todos os intervalos estudados e os valores otimizados obtidos para os parâmetros SWV estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1: Otimização dos parâmetros SWV para a determinação de metil paration utilizando eletrodo dopado com boro pré-tratado catodicamente.

PARÂMETROS	FAIXA ESTUDADA	VALORES OTIMIZADOS
Taxa de agitação (rpm)	250 a 2500	2000
Potencial de condicionamento (limpeza) (V)	+ 1,0 a + 2,0	+ 2,0
Tempo(s) de Condicionamento (Limpeza)	5 a 30	15
Potencial de ativação (V)	- 0,5 a - 2,0	- 2,0
Tempo de ativação (s)	15 a 180	15
Tempo de equilíbrio (s)	15 a 30	15
Etapa (mV)	1 a 10	7
Amplitude (mV)	10 a 100	50
Frequência (Hz)	10 a 100	30

Sob condições otimizadas, uma correlação linear entre a concentração de metil paration e a corrente de pico foi observada na faixa entre 0,5 e 16,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R = 0,998$). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram de 0,03 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, calculados como: $LD = 3 \times SD / S$ e $LQ = 10 \times SD / S$, onde SD é o desvio padrão do sinal em branco ($n = 10$) e S é a inclinação (sensibilidade) da curva analítica ($S = 0,154 \mu\text{A} / \mu\text{mol L}^{-1}$). Dois níveis de concentração de metil paration (0,5 e 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foram utilizados para o estudo de repetibilidade. Os valores de DPR obtidos para 15 medições consecutivas foram de 3,9 e 1,4% para 0,5 e 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. A reprodutibilidade intereletrodos ($n = 2$) foi avaliada comparando o sinal entre dois eletrodos DDB diferentes submetidos à mesma ativação eletroquímica, na qual foi obtido um DPR de 5,0%.

As análises intra-dia e inter-dia foram avaliadas pela comparação entre três medidas realizadas no mesmo dia e em dias diferentes (utilizando o mesmo eletrodo H-DDB), em que foram obtidos DPRs de 3,6 e 5,2% ($n = 3$), respectivamente. Como afirmado anteriormente, o metil paration pode adsorver em superfícies de carbono causando baixa reprodutibilidade

entre as medições (GARBELLINI, SALAZAR-BANDA, AVACA, 2009). Esses resultados de reprodutibilidade mostram a eficiência da etapa de limpeza otimizada na superfície do DDB para evitar a contaminação do eletrodo durante medições sucessivas. É importante mencionar que essa etapa de limpeza também auxilia na remoção de possíveis contaminantes da extração por Ponto Nuvem de amostras complexas como o mel, que podem ser adsorvidos na superfície do eletrodo. A Tabela 2 resume todas as características analíticas do método proposto.

Tabela 2: Características analíticas do método para determinação de metil paration usando eletrodo dopado com boro pré-tratado catodicamente.

Parâmetros analíticos	Valores obtidos
Sensibilidade ($\mu\text{A L}/\mu\text{mol}$)	0,154
Limite de detecção ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,03
Limite de quantificação ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,1
Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,5 a 16
Coefficiente de Correlação (R)	0,998
Repetibilidade (n = 15 para $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$)	3,9 %
Repetibilidade (n = 15 para $5 \mu\text{mol L}^{-1}$)	1,4 %
Inter-dia (n = 3)	5,2 %
Intra-dia (n = 3)	3,6 %
Intereletrodo (n = 2)	5,0 %

4.2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM

Na extração por ponto nuvem, a otimização dos parâmetros deve ser realizada para maximizar o fator de pré-concentração e a extração do analito na amostra. A escolha de um surfactante eletroinativo é crucial, para evitar interferências nos resultados eletroquímicos. Triton X-100 e X-114 são os mais amplamente aplicados para extração de metil paration em diferentes amostras. O Triton X - 100 foi utilizado neste trabalho, visto que a temperatura de formação do ponto de nuvem é de cerca de $65 \text{ }^\circ\text{C}$ (SATO, MORI, ITABASHI, 2013). Por outro lado, a temperatura de formação do ponto de nuvem usando Triton X-114 (surfactante da mesma família que o TX 100) está próxima da temperatura ambiente ($22 - 25 \text{ }^\circ\text{C}$), o que pode afetar a estabilidade da micela quando a temperatura do local onde a preparação da

amostra está sendo realizada varia e assim interferir na eficiência do processo de pré-concentração (SATO, MORI, ITABASHI, 2013).

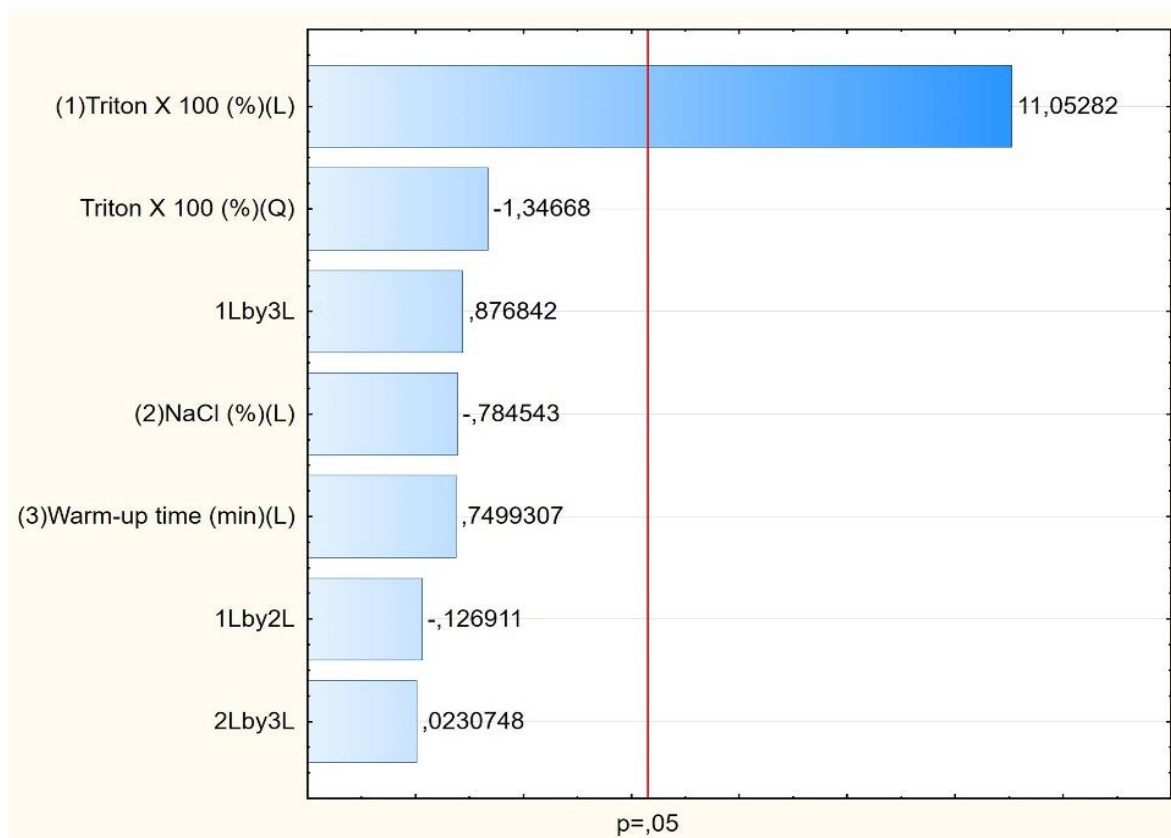
O desenvolvimento de CPE para uso em SWV consistiu em otimizar a concentração de cada componente de extração (NaCl e Triton X-100) e o tempo de aquecimento, analisando a significância de cada parâmetro operacional selecionado neste estudo, assim como suas interações nas etapas de extração. O fator de pré-concentração foi determinado através de estudo por planejamento fatorial completo 2³. Os níveis de cada parâmetro e seus sinais de corrente são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3: Condições do estudo de extração do metil paration utilizando planejamento fatorial completo (2³) e os respectivos sinais analíticos obtidos pelo método CPE-SWV.

Experimento	Triton X-100 (% m/v)	NaCl (% m/v)	Tempo de aquecimento (min)	I (µA)
1	0,5 (+)	2,0 (+)	60	0,0639
2	0,25 (-)	2,0 (+)	60	0,0141
3	0,5 (+)	1,0 (-)	60	0,0690
4	0,25 (-)	1,0 (-)	60	0,0155
5	0,5 (+)	2,0 (+)	30	0,0580
6	0,25 (-)	2,0 (+)	30	0,0132
7	0,5 (+)	1,0 (-)	30	0,0608
8	0,25 (-)	1,0 (-)	30	0,0174
9 (C)	0,375 (0)	1,5 (0)	45	0,0515
10 (C)	0,375 (0)	1,5 (0)	45	0,0395

As principais variáveis e suas interações são apresentadas no Gráfico de Pareto (Figura 8). Examinou-se os resultados por análise de variância (ANOVA), com um nível de confiança de 95% ($p = 0,05$). Um efeito é considerado significativo quando encontra-se acima do nível de confiança indicado pela linha vertical no Gráfico de Pareto. Ao analisar os resultados fornecidos pela tabela ANOVA, verificou-se um valor de $R^2 = 0,98432$ e MS residual = 0,00003760.

Figura 8: Gráfico de Pareto com base nos dados da Tabela 3 (pré concentração do metil paration por CPE).



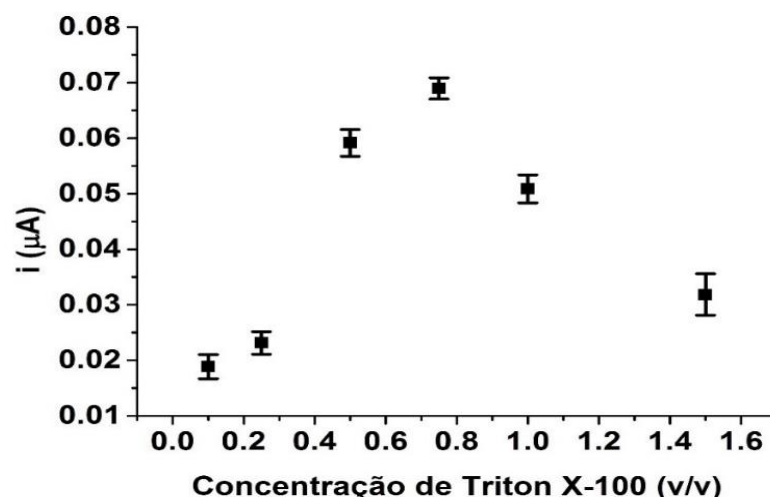
Pode-se observar no gráfico de Pareto (Figura 8) que apenas a variável concentração de Triton X-100 foi considerada significativa para o processo de extração e pré-concentração, apresentando efeito padronizado positivo (11,05), indicando que o aumento da concentração de surfactante na fase inicial causa um aumento no sinal analítico, exigindo um estudo mais amplo dessa variável. Ressalta-se que as concentrações de Triton X-100 utilizadas neste trabalho estão acima do CMC (0,021% m/v) garantindo a formação da micela que contém o metil paration. O tempo de aquecimento é outro parâmetro importante, pois está diretamente relacionado à taxa de formação de micelas e à facilidade de separação das fases aquosa e orgânica. Por outro lado, um longo tempo de aquecimento durante a extração pode se decompor ou volatilizar o analito (XIE et al., 2010).

A adição de sal pode alterar a densidade da fase aquosa, além de influenciar o processo de extração por gerar incompatibilidade entre as fases orgânica e aquosa, facilitando notavelmente a separação das fases (XIE et al., 2010). No entanto, a concentração de NaCl e o tempo de aquecimento não tiveram efeito significativo no nível de confiança de 95%. Assim, seus valores foram definidos com base no menor consumo de reagente e menor tempo de aquecimento, tornando a preparação da amostra mais rápida e minimizando os efeitos de decomposição ou volatilização do analito. Assim, as variáveis concentração de NaCl e tempo de aquecimento foram mantidas em seus níveis mais baixos, 1,0% m/v e 30 min, respectivamente.

Por ser a única variável que apresentou significância, a concentração do surfactante Triton X-100 foi avaliada por estudo univariado na faixa de 0,1 - 1,5% m/v e os resultados são ilustrados na Figura 9. Salienta-se que a concentração de surfactante é um dos parâmetros mais importantes que afetam a eficiência da CPE, uma vez que se a concentração de surfactante for baixa, a formação de micelas é prejudicada e a eficiência da extração diminui (SARIDAL, ULUSOY, 2019).

Conforme indicado na Figura 9, a resposta analítica aumenta até atingir a concentração de surfactante de 0,75% (m/v) e então a corrente diminui nas concentrações 1,0 e 1,5% m/v. Uma elevada concentração de Triton X-100 pode causar uma diminuição no fator de pré-concentração uma vez que uma maior quantidade de surfactante na fase micelar aumenta a viscosidade das soluções de análise causando uma diminuição no sinal de corrente devido à redução no transporte de massa (coeficiente de difusão) do metil paration para a superfície do eletrodo (GAO et al, 2019). Esse fato foi observado no uso de concentrações de surfactantes acima de 0,75% (m/v), onde as correntes obtidas foram diminuídas. Portanto, selecionou-se o TX-100 na concentração de 0,75% (m/v) para as etapas sequenciais.

Figura 9: Otimização da concentração de Triton X-100 e a resposta analítica do MP no DDB. Condições otimizadas: tampão Britton-Robinson (BR) a 0,1 mol L⁻¹ pH 6,0; Frequência: 30 Hz; Amplitude: 50 mV; incremento de potencial: 7 mV; Potencial de condicionamento: +2,0 V (por 15 s), Potencial de deposição: -2,0 V (por 15 s); Tempo de equilíbrio: 15 s e Velocidade de agitação: 2000 rpm.



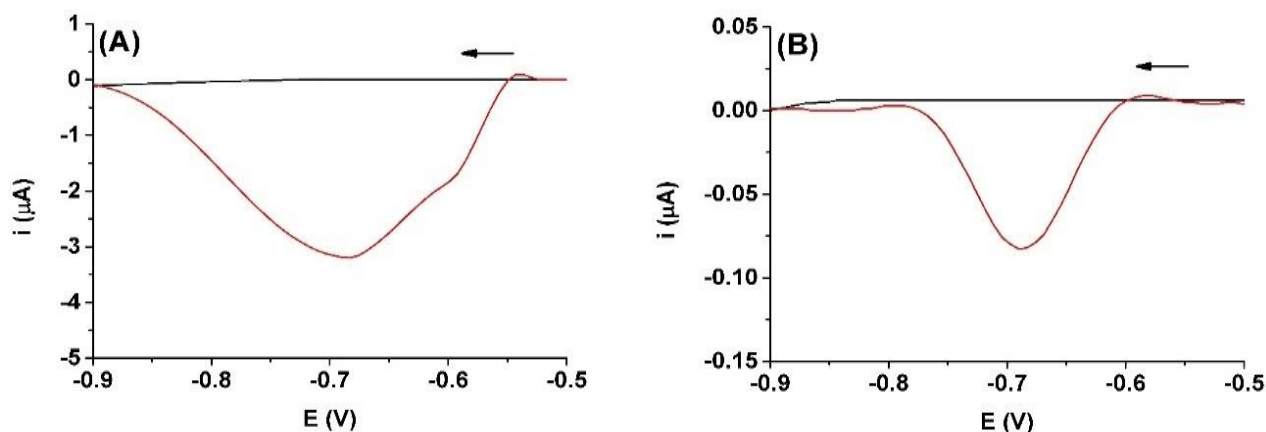
Em resumo, as condições otimizadas para extração e pré-concentração de metil paration obtidas com o planejamento fatorial completo foram: Triton X – 100 0,75% (m/v); NaCl 1,0% (m/v) e tempo de aquecimento de 30 min.

4.3. CALIBRAÇÃO E COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS COM E SEM EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM

É importante mencionar que antes do procedimento de extração por ponto nuvem, um experimento foi feito para verificar a presença de metil paration no mel utilizado, realizando uma simples diluição da amostra no eletrólito. Para isso, diferentes volumes de amostras de mel foram diretamente diluídas em tampão BR pH 6 e medidos pelo método SWV proposto. No entanto, mesmo utilizando grandes fatores de diluição (0,2 mL de mel por 5,0 mL de eletrólito), não foi possível obter resultados satisfatórios. Como pode ser visto na Fig. 10(A), a linha de base obtida em tal condição é ruidosa, instável e ampla. Como consequência, nenhum pico satisfatório foi obtido após a adição de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de metil paration neste meio (Fig. 10A).

A matriz do mel é um complexo que contém macromoléculas (carboidratos, proteínas, vitaminas) que podem ser eletroativas ou causar a inibição de alguns sítios eletroativos na superfície do eletrodo. Além disso, a adição de mel torna o eletrólito mais viscoso o que provoca uma redução no transporte de massa de metil paration para a superfície do eletrodo e consequentemente diminui a resposta analítica.

Figura 10: Voltamogramas de SWV para amostra de mel diluída diretamente em eletrólito, sem CPE (linha vermelha em A) e após tratamento otimizado da amostra de mel com CPE (linha vermelha em B). Os respectivos voltamogramas registrados para o branco são as linhas pretas. Condições estudadas na otimização (Tabela 11). Eletrólito de suporte: tampão BR pH 6. [MP] em A: $10 \mu\text{mol L}^{-1}$; [MP] em B: $1 \mu\text{mol L}^{-1}$.



Por outro lado, na Figura 10 (B), a melhora do sinal SWV é perceptível após o uso do procedimento de CPE otimizado para a amostra de mel com $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de metil paration. Esse procedimento de extração e pré-concentração ajudou a contornar os efeitos da matriz da amostra, eliminando algumas interferências responsáveis pela perturbação do sinal, como visto em (A). Além disso, pode-se observar que o pico de redução do metil paration apresentou boa resolução no potencial de $-0,68\text{V}$ e linha de base estável.

O efeito absoluto da matriz (MEa), o qual foi calculado conforme descrito na literatura usando a fórmula (1) (KOJRO et al., 2019):

$$\text{MEa} = \frac{\text{"altura do pico do analito em uma matriz após CPE"}}{\text{"altura do pico do analito em um eletrólito de suporte"}} \times 100\% \quad (1)$$

O cálculo é baseado na relação entre a altura do pico na redução do metil paration presente na matriz do mel após o CPE otimizado e a altura do pico do metil paration presente apenas no eletrólito suporte composto por tampão BR pH 6. É importante ressaltar que a matriz utilizada neste experimento foi obtida através da amostra de mel após aplicação da extração por ponto nuvem com Triton X-100 e diluição no eletrólito suporte presente na célula eletroquímica. Para este estudo, a concentração de metil paration utilizada foi de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Um trabalho anterior relatou que um valor de MEa abaixo de 85% indica supressão do sinal durante a leitura, enquanto valores acima de 115% indicam um aumento no sinal (KOJRO et al., 2019). Para valores entre 85 e 115% o efeito de matriz é desprezível. O valor

obtido neste trabalho foi de 75% indicando que houve uma pequena diminuição nas correntes de pico para o metil paration. Essa diminuição de corrente está relacionada à presença do tensoativo Triton X – 100 durante a extração por ponto nuvem, que, como mencionado anteriormente, quando adicionado na fase micelar, aumenta a viscosidade da solução de célula eletroquímica, o que diminui o transporte de massa de metil paration para a superfície do eletrodo.

Segundo Krojo et al. (2019), o efeito da matriz sobre a CPE está diretamente relacionado à presença e aumento da concentração de surfactante. Este efeito é semelhante ao encontrado em outros trabalhos publicados na literatura, onde a presença de Triton X – 100 causou diminuição dos sinais de corrente na determinação de alguns metais, como Cd, Pb (GOUVEIA-CARIDADE, BRETT, 2006) e Ni (HRASTNIK, JOVANOVSKI, HOČEVAR, 2020) e tujona (substância ativa de origem vegetal) (KOWALCZE, JAKUBOWSKA, 2018). No entanto, a diminuição nos valores atuais de MP causada pela presença de Triton X – 100 foi pequena e a melhora na resolução do sinal após o uso de CPE foi significativa e vantajosa quando comparada às medições feitas diretamente no mel. Assim, a CPE diminuiu notavelmente os efeitos dos interferentes presentes no mel na redução eletroquímica de MP, permitindo análises mais confiáveis e reprodutíveis. Após otimizações de CPE e SWV, as características analíticas de CPE-SWV foram investigadas e comparadas com os mesmos parâmetros obtidos sem a etapa de CPE. Os parâmetros obtidos pelo método SWV com e sem uma etapa de CPE anterior estão resumidos na Tabela 4.

Tabela 4: Características analíticas para determinação de metil paration com e sem CPE.

Parâmetros analíticos	Sem CPE (SWV)	Com CPE (CPE-SWV)
Sensibilidade ($\mu\text{A L}/\mu\text{mol}$)	0,154	0,937
Limite de detecção ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,03	0,006
Limite de quantificação ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,1	0,021
Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,5 – 16,0	0,125 – 2,0
Coefficiente de Correlação (R)	0,998	0,998
Fator de pré-concentração	-----	6,1

A faixa linear foi obtida entre 0,125 e 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com excelente coeficiente de correlação linear ($R^2 = 0,998$) após uso da CPE. Essa faixa linear foi menor em relação ao resultado obtido antes da CPE. Essa mudança pode estar relacionada à presença de Triton X-100 no método usando CPE, que, como discutido anteriormente, aumenta a viscosidade da solução e diminui a taxa de transferência de massa de metil paration para o eletrodo (RUSINEK et al., 2015). Mesmo aumentando a concentração do analito na célula eletroquímica, o eletrodo não pôde responder linearmente conforme o esperado e o intervalo diminui.

Apesar da menor faixa linear, a concentração de agrotóxicos comumente encontrados no mel é baixa e o método após a CPE foi mais sensível e apresentou menor limite de detecção quando comparado sem a etapa de extração por ponto nuvem. Além disso, para amostras que contêm concentrações acima da faixa linear, o aumento da diluição da amostra no eletrólito após a CPE contorna o problema. Os limites de detecção e quantificação foram calculados conforme descrito na seção 3.1. Os valores de LD e LQ obtidos pelo método CPE-SWV foram de 0,006 e 0,021 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Considerando a densidade do mel, o valor LD foi de 1,16 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e o LQ foi de 4,06 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Esses resultados confirmam que a CPE proporcionou uma melhoria de 5 vezes no LD quando comparado ao valor obtido com a detecção direta de metil paration (apenas diluição de metil paration no eletrólito).

O fator de pré-concentração foi calculado pela razão entre a inclinação da curva obtida com CPE e a inclinação obtida sem CPE (diluição direta do padrão metil paration no eletrólito de suporte) (RUSINEK et al., 2015), conforme mostrado na literatura (RUSINEK et al., 2015; SARIDAL, ULUSOY, 2019; LUO et al., 2019; MARÍN et al., 2020). Assim, a etapa CPE promoveu um aumento na sensibilidade de 6,1 vezes. Além disso, como apresentado na Figura 10, o metil paration não pôde ser medido diretamente em amostras de mel (logo após a diluição no eletrólito). Assim, o método CPE-SWV desenvolvido foi empregado na determinação de metil paration em amostras de mel.

4.4. APLICAÇÃO DO MÉTODO CPE-SWV PARA DETERMINAÇÃO DE METIL PARATION EM AMOSTRAS DE MEL

A preparação da amostra foi realizada após a otimização da CPE. Exatamente 200 μL da fase orgânica extraída das amostras de mel foram diluídos em 4,8 mL de eletrólito de suporte contido na célula eletroquímica. Não foi detectado metil paration em nenhuma das

amostras de mel analisadas pelo CPE-SWV usando o eletrodo DDB. A precisão do método foi avaliada por testes de adição e recuperação utilizando quantidades conhecidas de metil paration (0,25, 0,5 e 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ equivalente a 48,4, 96,8 e 193,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente) que foram adicionadas às amostras de mel.

A Tabela 5 mostra os valores de recuperação para o metil paration no mel obtidos após a análise CPE-SWV. De acordo com os resultados, o método proposto foi preciso e exato, com valores aceitáveis de recuperação entre 94 - 106%. Além disso, foram encontrados baixos desvios-padrão (entre $\pm 0,02$ e $\pm 0,06 \mu\text{mol L}^{-1}$), demonstrando a confiabilidade do método proposto.

Tabela 5: Valores de recuperação encontrados pelo método CPE-SWV em duas amostras de mel (A e B) fortificadas com concentração conhecida de metil paration.

Amostras	Encontrado antes da CPE ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Metil paration fortificado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado após fortificação ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
A	<LD	0,25	$0,25 \pm 0,02$	99 ± 8
	<LD	0,5	$0,47 \pm 0,02$	94 ± 3
	<LD	1,0	$1,06 \pm 0,04$	106 ± 4
B	<LD	0,5	$0,53 \pm 0,03$	104 ± 6
	<LD	1,0	$0,99 \pm 0,06$	98 ± 6

O tempo total de análise do método CPE – SWV foi calculado através do tempo necessário para o tratamento das amostras de mel e aplicação de CPE (1 h para 8 amostras) somado ao tempo de cada leitura eletroquímica por SWV (45 s). Considerando que o tempo necessário para o tratamento das amostras por CPE é o mesmo, o tempo para a determinação eletroquímica de metil paration pelo método proposto (45 s) foi sensivelmente menor quando comparado ao tempo de retenção das leituras cromatográficas que também utilizam CPE em preparação de amostras, por exemplo, por GC-FPD (11 min) (ZHAO et al., 2011) ou HPLC (7,5 min) (SEEBUNRUENG et al., 2011). Além disso, o LD do método proposto neste trabalho ($1,16 \mu\text{g kg}^{-1}$) é menor ou próximo quando comparado com trabalhos que empregaram HPLC ($30 \mu\text{g kg}^{-1}$) (SEEBUNRUENG et al., 2011) ou GC-FPD ($1,5 \mu\text{g kg}^{-1}$) (ZHAO et al., 2011). Por outro lado, a determinação simultânea realizada por técnicas eletroquímicas é dificultada à medida que aumenta o número de compostos estruturalmente semelhantes (contendo o mesmo centro eletroativo) a serem analisados na mesma amostra, o

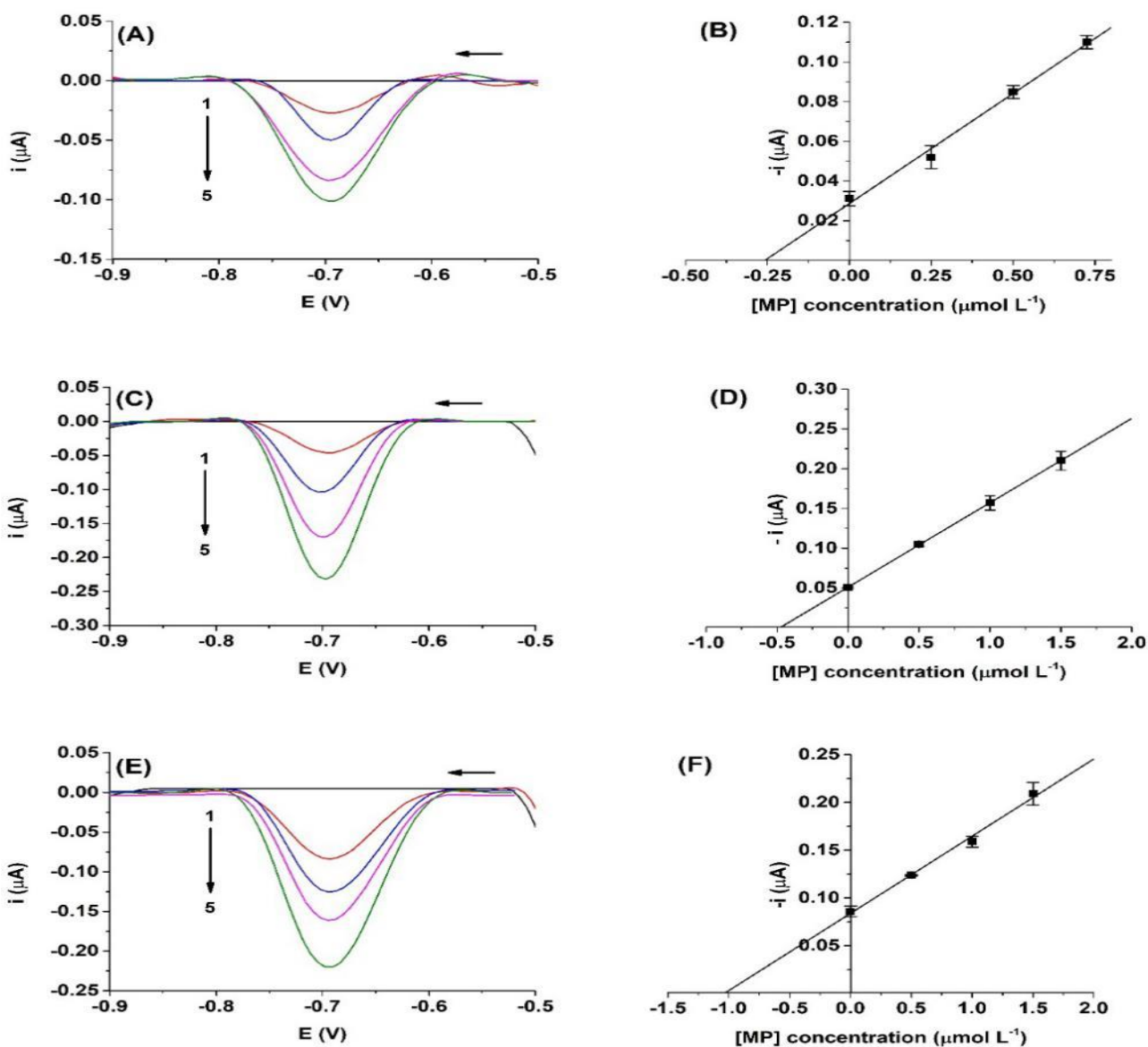
que é facilitado pelos métodos cromatográficos constituindo uma vantagem.

Tabela 6: Valores de recuperação obtidos pelo método CPE-SWV em duas amostras de mel enriquecidas com quantidades conhecidas de metil paration (n=3).

Amostras	Encontrado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Metil paration fortificado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentração encontrada após fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)
A	< LD	48,4	48 \pm 4	99 \pm 8
	< LD	96,8	91 \pm 2	94 \pm 3
	< LD	193,5	205 \pm 6	106 \pm 4
B	< LD	48,4	50 \pm 2	102 \pm 5
	< LD	96,8	102 \pm 5	104 \pm 5
	< LD	193,5	193 \pm 12	99 \pm 7

Os resultados de SWV após aplicação da extração por ponto nuvem para amostras de mel enriquecidas e as respectivas curvas de adição padrão para a determinação de metil paration em amostras de mel são mostradas na Fig. 11. Os sinais representam as amostras de mel fortificadas com metil paration em diferentes níveis de concentração após CPE e 25 vezes diluídas em solução tampão BR pH 6. Todos os coeficientes de correlação linear (R^2) foram maiores que 0,988. A quantificação de metil paration foi realizada pelo método de adição padrão. Pode-se observar que nenhum sinal indesejado da matriz orgânica do mel foi obtido nas condições otimizadas. Isso infere que o procedimento de otimização de CPE foi bem sucedido e não houve interferência na quantificação de metil paration em diferentes amostras de mel. Picos bem definidos de redução de metil paration foram obtidos em -0,68V. Além disso, não foram observados desvios de potencial de pico dentro da janela de potencial. É importante mencionar que após o uso do CPE as amostras de mel apresentaram aspecto límpido (transparente).

Figura 11: Esquerda: (A, C e E) voltamogramas (fundo corrigido) para determinação de metil paration em amostras de mel enriquecidas com soluções padrão para resultar nas seguintes concentrações finais na célula: (A) $0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($48,4 \mu\text{g kg}^{-1}$), (C) $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($96,8 \mu\text{g kg}^{-1}$) e (E) $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($193,5 \mu\text{g kg}^{-1}$). 1ª varredura refere-se ao eletrólito; 2ª varredura para amostras com mel; 3ª a 5ª varreduras após adição de soluções padrão de metil paration. Direita: (B, D e F) respectivas curvas analíticas ($R^2=0,988$ em B, $R^2=0,999$ em D, $R^2=0,990$ em F).



O regulamento europeu 396/2005 e do Conselho sobre os níveis máximos de resíduos (LMRs) de pesticidas em alimentos e rações de origem vegetal e animal e alterando a Diretiva do Conselho 91/414/EEC (EUROPEAN REGULATION, 2005) relata que o nível

máximo permitido de metil paration no mel deve ser 10 mg kg⁻¹. No Brasil, a Instrução Normativa nº 5 de 2019 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (NORMATIVE INSTRUCTION, 2019) estabelece o limite máximo de 20 mg kg⁻¹ de metil paration no mel. O LD do método proposto (1,16 mg kg⁻¹) é baixo o suficiente para atender aos limites máximos estabelecidos de metil paration em mel aprovado para consumo humano.

4.5. SELETIVIDADE (ESTUDO DE INTERFERÊNCIA)

O estudo de possíveis interferentes presentes em amostras de mel foi realizado por medidas voltamétricas de metil paration utilizando o DDB nas mesmas condições experimentais otimizadas. Foi considerado um limite de tolerância de ±10% para a variação na corrente de pico de 0,5 µmol L⁻¹ de metil paration na presença e ausência de interferentes conforme descrito na literatura recente (PINAR et al., 2020; SQUISSATO, RICHTER, MUNOZ, 2019). A razão de concentração entre interferentes e metil paration (interferentes: metil paration) foi estudado em dois níveis, 1:1 e 5:1. Verificou-se que a presença de 1:1 ou 5:1 dos íons coexistentes Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Cl⁻, SO₄²⁻, PO₄³⁻, NO₃⁻ não apresentou nenhum efeito de interferência no sinal intensidade ou deslocamento do potencial de redução de metil paration. Além disso, avaliou-se a influência dos agrotóxicos fipronil (comumente utilizado na apicultura), diazinon, deltametrina, clorpirifós, malation, bem como dos herbicidas atrazina e 2,4 D.

Os resultados mostraram que a intensidade do sinal de metil paration não se alterou dentro da faixa tolerável (±10%) nas proporções 1:1 e 5:1 na presença de fipronil, diazinon, deltametrina, malathion, atrazina e 2,4D. Não foi observado deslocamento do potencial de pico ou qualquer sinal indesejável dentro da janela de potencial estudada (-0,5 a -0,9V) que pudesse comprometer a determinação do metil paration. Por outro lado, a presença de clorpirifós causou diminuição do sinal de metil paration em 16,3% e 22,7% quando a relação interferente: metil paration foi de 1:1 e 5:1, respectivamente. Apesar da diminuição do sinal, não foram observados outros sinais voltamétricos além do metil paration e o método de adição padrão pode solucionar possíveis efeitos de interferência causados pela presença de clorpirifós. Ressalta-se que o método proposto aplicado a amostras reais de mel não apresentou efeitos de interferência de outros compostos, pois os valores de recuperação ficaram na faixa entre 94 e 100%.

A Tabela 7 apresenta uma comparação entre os parâmetros analíticos obtidos com a metodologia desenvolvida neste capítulo com os das publicações reportadas na literatura.

Tabela 7: Comparação entre as características analíticas do método proposto e outros métodos eletroanalíticos relatados na literatura para determinação de MP em diferentes amostras.

Amostra	Técnica	Eletrodo	Técnica de extração	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LQ (nmol L^{-1})	t_{leitura} (s)	Referência
Vegetais	DPV	BCL@MOF nanofibers/chitosan/GCE	Extração com metanol	0,1 – 38,0	67	n,r,	WANG et al., 2019
Vegetais	AMP	AChE–SF/MWNTs/GCE	Extração com éter	3,5 – 20,0	500	50	XUE et al., 2012
Água de torneira	AMP	OPH-based sensor	Diluição no eletrólito	5 – 82	2	n,r,	STOYTCHEVA et al., 2014
Solo, suco de batata e água	DPV	GNBG immobilized in Naf/GCE	n,r,	0,02 – 0,153	6	n,r,	SINGH et al., 2019
Solução aquosa	CV	AChE–Au–PPy/GCE	Diluição no eletrólito	0,018 – 0,45	7,5	40	GONG, WANG, ZHANG, 2009
Vegetal	AMP	ITO-CuO	Extração com tampão fosfato	0,01 – 0,16	6,7	n,r,	TUNESI et al., 2018
Urina e suco de tomate	DPV	NiO-SPE	Diluição no eletrólito	0,1 – 30	24	80	KHAIRY, AYOUB, BANKS, 2018
Vegetais	AMP	Ag@GNRs/SPCE	Extração com tampão fosfato	0,005 – 2780	5	50	GOVINDASAMY et al., 2017
Água residual e água do mar	DPV	NPG/GCE	Diluição no eletrólito	0,5 – 150	20	n,r,	GAO et al., 2019
Água potável	DPCSV	CPME	Diluição no eletrólito	0,1 – 50	39	300	OLIVEIRA et al., 2017

Tangerina	CV	MIP/AuNPs/GCE	Extração com éter dietílico	0,050 – 15	10	12	WANG et al., 2018
Água do rio	CV	MIP/N-GS/Au	Diluição no eletrólito	0,37 – 37	37	24	XUE et al., 2014
Suco de maçã	DPV	Au/chitosan fiber-modified BDD	Diluição no eletrólito	10 – 200	800	n,r,	JIN, LIU WEI, 2013
Amostras de água	SWV	CPE-ZrO ₂	Diluição no eletrólito	0,02 – 12,7	8	600	PARHAM, RAHBAR, 2010
Nd	CV	<i>Escherichia coli</i> -SPCE	n,r,	2 – 80	500	24	KUMAR, D'SOUZA, 2011
Amostras de água	DPAd SV	MWCNTs-PAAM/GCE	Diluição no eletrólito	0,005 – 10	2	300	ZENG et al., 2012
Frutas e vegetais	DPV	GO-SPCE	Extração com tampão fosfato	0,03 – 670	1,2	32	MANAVALAN et al., 2020
Amostras de mel	DPV	Hanging Hg working electrode	Extração com clorofórmio	n,d,	196	30	TSIAFOULIS, NANOS, 2010
Amostras de mel	SWV	BDD	CPE	0,125 – 2,0	6	45	ESTE TRABALHO

n.r.: Não reportado; BCL: lipase de Burkholderia cepacia; MOF: Estruturas metal-orgânicas; GCE: Eletrodos de carbono vítreo; AChE: Acetilcolinesterase; SF: fibroína de seda; MWNTs: nanotubo de carbono multiwall; ITO: Óxido de índio-estanho; CuO: Óxido de cobre; NiO: óxido de níquel; SPE: eletrodos serigrafados; Sensor baseado em OPH: Biossensor amperométrico de organofosforado hidrolase; Ag@GNRs: nanofitas de grafeno suportadas por partículas de prata; SPCE: eletrodo de carbono serigrafado; NPG: ouro nanoporoso; CPME: eletrodo de pasta de carbono modificado com biochar; DPCSV: voltametria de stripping catódico de pulso diferencial; CPE-ZrO₂: eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas de ZrO₂; MWCNTs-PAAM: nanotubos de carbono de paredes múltiplas – poli(acrilamida); GO: nanofolhas de óxido de grafeno MIP: polímero de impressão molecular; AuNPs: Nanopartículas de Ouro, N-GS: folhas de grafeno dopadas com nitrogênio; Au: ouro; GNBG: nanopartícula de ouro/vermelho neutro-BSA (albumina de soro bovino)-grafeno; Naf: Nafion; BDD: Diamante dopado com boro; PPy: Polipirrol; Glu: glutaraldeído; s-SWCNTs: nanotubos de carbono de parede simples; AMP: Amperometria; DPV: Voltametria de Pulso Diferencial; CV: Voltametria cíclica; SWV: Voltametria de onda quadrada;

Pode-se observar que o trabalho proposto apresentou limite de detecção inferior a alguns artigos e próximo a outros que utilizaram biossensores (XUE et al., 2012; TUNESI et al., 2018; STOYTCHIEVA et al., 2014; GONG, WANG; ZHANG, 2009; KUMAR, SOUZA, 2011; WANG et al., 2019; SINGH et al., 2019; KUMAR, SUNDRAMOORTHY, 2019). Um dos estudos utilizando biossensores apresentou valores de LD inferiores ao método proposto (KUMAR, SUNDRAMOORTHY, 2019). No entanto, a amostra investigada neste trabalho foi uma solução padrão contendo eletrólito suporte e adições de concentrações conhecidas de MP. Assim, a influência da matriz das amostras reais não foi considerada. Em outros trabalhos citados na Tabela 7, a determinação de metil paration utilizando eletrodos serigrafados modificados é mostrada (GOVINDASAMY et al, 2017; KHAIRY, AYOUB, BANKS, 2018; MANAVALAN et al., 2020). Em um desses trabalhos, o LD do método proposto foi menor (KHAIRY, AYOUB, BANKS, 2018), enquanto em um segundo trabalho, o LD encontrado foi maior (GOVINDASAMY et al., 2017). Comparando o método proposto neste capítulo com alguns estudos utilizando eletrodos modificados com um polímero de impressão molecular (MIP) (XUE, et al., 2014; WANG et al., 2018), o CPE-SWV apresentou LD menor.

Um dos únicos estudos que analisou metil paration em mel apresentou LD maior em relação a este capítulo (TSIAFOULIS, NANOS, 2010). Além disso, os autores utilizaram o eletrodo de mercúrio que apresenta algumas vantagens na determinação de agrotóxicos em mel, como boa reprodutibilidade, estabilidade, sensibilidade, ampla faixa de potencial catódico e processos adsorptivos irreversíveis mínimos na superfície do eletrodo de Hg. No entanto, seu uso vem decaindo devido à alta toxicidade ao analista e/ou ao meio ambiente, além do acúmulo de resíduos gerados após cada análise (GONÇALVES-FILHO, SILVA, SOUZA, 2020; WAHEED, MANSHA, ULLAH, 2018; LU et al, 2018; ARIÑO et al, 2017).

Em relação ao eletrodo de DDB utilizado neste capítulo, nenhuma modificação da superfície do eletrodo de trabalho se tornou necessário. Os trabalhos citados na Tabela 7 para a determinação de MP propuseram o uso de eletrodos modificados quimicamente e/ou eletroquimicamente ou por imobilização de enzimas sobre a superfície do eletrodo. As etapas de modificação de um eletrodo requerem atenção sendo uma tarefa muito desafiadora e o sucesso desta etapa reflete diretamente no desempenho do eletrodo (KHAIRY, AYOUB, BANKS, 2018; RHOUATI, MAJDINASAB, HAYAT, 2018).

O eletrodo DDB tem recebido atenção de pesquisadores ao longo dos anos por apresentar diversas vantagens sobre eletrodos de carbono tradicionais, como carbono vítreo e pasta de carbono (PINAR et al, 2020). Essas vantagens incluem: (i) uma janela de potencial eletroquímico maior que amplia a variedade de moléculas que podem ser determinados em potenciais mais altos (positivos ou negativos), (ii) baixas correntes de fundo, (iii) alta resistência química e mecânica, (iv) biocompatibilidade, (v) cinética de transferência de elétrons rápida, (vi) alto poder de oxidação que pode ser usado para garantir a limpeza do eletrodo e evitar a contaminação da superfície por adsorção, (vii) estabilidade em meio ácido e alcalino e custo mínimo de número de reagentes e etapas de manuseio antes das leituras (PINAR et al, 2020; LOURENCAO et al, 2020; FREITAS et al., 2019).

É importante mencionar que a determinação de metil paration em amostra de mel foi possível usando o eletrodo DDB não modificado, evitando as tediosas etapas de modificação. A comparação dos trabalhos citados na Tabela 7 com o eletrodo DDB utilizado neste capítulo mostra que apenas o eletrodo de gota de mercúrio (TSIAFOULIS, NANOS, 2010) não foi modificado para a determinação de metil paration. Todos os outros exemplos mostraram eletrodos modificados por diferentes procedimentos. Apenas quatro (KUMAR, SUNDRAMOORTHY, 2019; GOVINDASAMY et al., 2017; MANAVALAN et al., 2020; ZENG et al, 2012) dos dezenove estudos citados na Tabela 7 apresentaram valores de LD inferiores ou próximos ao obtido neste capítulo com o uso do eletrodo DDB para determinação de metil paration.

A modificação da superfície dos eletrodos muitas vezes leva a resultados de baixa reprodutibilidade, requer uma etapa de preparação e modificação demorada do eletrodo e aumenta os gastos com reagentes e componentes (enzimas, nanomateriais, células, etc.) (PINAR et al, 2020). A modificação pode ser facilmente desfeita por contato mecânico, eletrólito inadequado e aplicação de altos potenciais. Nesse mesmo sentido, a vida útil dos biossensores é um fator determinante durante a análise e deve receber atenção especial no controle de alguns parâmetros, como potencial aplicado, eletrólito, pH e temperatura para que não haja desnaturação de enzimas e/ou ou morte de bactérias usadas para modificar a superfície do eletrodo (KHAIRY, AYOUB, BANKS, 2018; THIVYA, RAMYA, WILSON, 2020; LI et al, 2014). Além disso, eletrodos modificados por enzimas podem ser afetados por diferentes contaminantes, como metais pesados que comprometem a seletividade do método durante a determinação de organofosforados (KHAIRY, AYOUB, BANKS, 2018; RHOUATI, MAJDINASAB, HAYAT, 2018; GU et al, 2020).

O resultado é a perda de reprodutibilidade, vida curta do eletrodo e interrupção das análises para realizar uma nova e tediosa etapa de modificação, Considerando que o tratamento eletroquímico leva apenas 30 s, o uso do eletrodo DDB sem nenhuma modificação teve um desempenho melhor do que a maioria dos trabalhos citados, incluindo rapidez nas leituras, simplicidade, baixo custo e alta detectabilidade do metil paration.

5. CONCLUSÃO

Neste capítulo, um novo método foi desenvolvido para determinação de metil paration em amostras de mel usando extração por ponto nuvem (CPE) acoplada à detecção voltamétrica de onda quadrada (SWV) em um eletrodo de diamante dopado com boro (DDB). Os parâmetros de CPE (concentração de surfactante Triton X-100, concentração de NaCl e tempo de aquecimento) bem como os parâmetros de SWV (frequência, degrau, amplitude, potencial de condicionamento) foram investigados e otimizados. O CPE-SWV proposto apresentou curto alcance linear, mas sensibilidade 6 vezes maior em comparação ao valor obtido sem a etapa de extração por ponto nuvem (diluição direta de metil paration em eletrólito suporte), indicando a eficácia da etapa CPE para pré-concentração de metil paration e redução de interferência na matriz da amostra. Além disso, foram obtidos valores de recuperação satisfatórios com o método proposto para a determinação de metil paration em amostras de mel enriquecidas, o que não seria possível sem a etapa CPE, devido às interferências no pico de redução de metil paration. Assim, a combinação de CPE e SWV é uma grande promessa para a determinação de pesticidas em amostras complexas (alimentos, ambientais, etc), devido ao uso de instrumentação portátil e de baixo custo, emprego de pequena quantidade de reagentes de baixa toxicidade e uso de um eletrodo de trabalho não modificado.

REFERÊNCIAS

AHMADI-JOUIBARI, T.; FATTAHI, N.; SHAMSIPUR, M. Rapid extraction and determination of amphetamines in human urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction and solidification of floating organic drop followed by high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.*, 94:145-51, **2014**.

ALBARNAZ, K. S. “Desenvolvimento de método multirresíduo para determinação de agrotóxicos em suco de uva integral utilizando método quechers acetato e LC-MS/MS”. Rio Grande do Sul. Programa de Pós-graduação em Química, UFSM, 2021. Dissertação de Mestrado, 119p.

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

AMWEG, E. L.; WESTON, D. P.; UREDA, N. M. Use and toxicity of pyrethroid pesticides in the Central Valley, California, USA. *Environ Toxicol Chem*, 24: 966-972, **2005**.

AMDE, M.; TAN, Z. Q.; JU, R.; LIU, J. F. Nanofluid of zinc oxide nanoparticles in ionic liquid for single drop liquid microextraction of fungicides in environmental waters prior to high performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*, 1395, 7 – 15, **2015**.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC International*, 86: 412 – 431, **2003**.

ANDRADE, A. S.; QUEIROZ, V, T.; LIMA, D, T.; DRUMOND, L. C. D. Análise de risco de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas em municípios do alto paranafba – MG. *Quim. Nova*, 34: 1129-1135, **2011**.

ANGLIN, C.; MCKINLEY, W. P. Procedure for Cleanup of Plant Extracts Prior to Analyses for DDT and Related Pesticides. *Agricultural and Food Chemistry*, 8: 186-189, **1960**.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Agrotóxicos e Toxicologia*. 2009. Brasília, disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia>, acessada em outubro 2019.

ANVISA, 2018. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=5578706&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=publicada-reclassificacao-toxicologica-de-agrotoxicos-&inheritRedirect=true. Acesso em març. 2020.

ANVISA, 2022. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/c/4235json-file-1/view>. Acesso em març. 2022.

ANVISA. *Agrotóxico e toxicologia*. São Paulo, 2016. Acessado em fev de 2022.

ARAÚJO, J. M. *Química de Alimentos: teoria e prática*. 2 ed. Viçosa: Ed Viçosa UFV; 1999. 416 p.

ARINO, C.; SERRANO, N.; DÍAZ-CRUZ, J. M.; ESTEBAN, M. Voltammetric determination of metal ions beyond mercury electrodes. A review. *Anal. Chim. Acta*, 990: 11–53, **2017**.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.*, 62: 2145 – 2148, **1990**.

AZZOUZ, A.; KAILASA, S. K.; KUMAR, P.; BALLESTEROS, E.; KIM, K. H. Advances in functional nanomaterial-based electrochemical techniques for screening of endocrine disrupting chemicals in various sample matrices. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 113, 256–279, **2019**.

BAI, D.; LI, J.; CHEN, S. B.; CHEN, H. A Novel Cloud-Point Extraction Process for Preconcentrating Selected Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Aqueous Solution. *Environmental Science Technology*. 35: 3936 – 3940, **2001**.

BAIRD, C.; CANN, M. C. *Química Ambiental*. Bookman, 4º Ed. Porto Alegre, 2011.

BAKAR, N. K. A.; JAMIL, A. K. M. J.; ABDULHUSSEIN, A. Q. Cloud point extraction (CPE) coupled with QuEChERS for extraction and clean up of neonicotinoid pesticide residues in honey. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 4: 45 – 52, **2022**.

BARAKAT, A. A.; BADAWY, H. M. A.; SALAMA, E.; ATTALLAH, E.; MAATOOK, G. Simple and rapid method of analysis for determination of pesticide residues in honey using dispersive solid phase extraction and GC determination. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 5: 97 – 100, **2007**.

BARCELÓ, D.; HENNION, M. C. *Trace determination of pesticides and their degradation products en water*. 3 ed. Amsterdam: Elsevier, 1997, 542 p.

BARKER, S. A.; LONG, A. R.; SHORT, C. R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *J Chromatogr*, 475: 353 – 361, **1989**.

BASF. Disponível em: <<http://www.agro.basf.com.br/produtos>>. Acesso em: 10 mar. 2020.

BAZEL, Y.; TUPYS, A.; OSTAPIUK, Y.; TYMOSHUK, O.; MATIYCHUK, V. A green cloud-point microextraction method for spectrophotometric determination of Ni (II) ions with 1-[(5-benzyl-1, 3-thiazol-2-yl) diazenyl] naphthalene-2-ol. *J. Mol. Liq.*, 242: 471 – 477, **2017**.

BEITOLLAHI, H.; MOHAMMADI, S. Z.; SAFAEI, M.; TAJIK, S. Applications of electrochemical sensors and biosensors based on modified screen-printed electrodes: a review. *Anal. Methods*, 12: 1547–1560, **2020**.

BODRATTI, A. M.; ALEXANDRIDIS, P. Amphiphilic block copolymers in drug delivery: advances in formulation structure and performance. *Expert Opin Drug Deliv*, 15: 1085 – 1104, **2018**.

BRASIL. *Decreto nº 4.074*, de 04 de janeiro de 2002.

BRASIL, *Decreto no 4.074 de 04 de janeiro de 2002 que regulamenta a Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989*. 2002, disponível em:

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm, acessada em abril 2019.

BRASIL, *Instrução Normativa nº 11 de 20 de outubro de 2000 que aprovou o regulamento técnico de Identidade e Qualidade do Mel*, 2000, disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7797>, acessado agosto 2019.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. *Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental*. Brasília: Ibama, 2010.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. *Agrotóxicos*, disponível em: www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos, acessada em dezembro 2019.

BUDAVARI, S. (ed.). *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 1996., 508p.

CABRAS, P.; ANGIANI, A.; GARAU, V.L.; MELIS, M.; PIRISI, CABITZA, F.; PALA, M. The effect of simulated rain on folpet and mancozeb residues on grapes and on vine leaves. *Journal of Environmental Science and Health – Part B*, 36: 609-618, **2001**.

CAMPOS, E.; FREIRE, C.; NOVAES, C. O.; KOIFMAN, R. J.; KOIFMAN, S. Exposição a pesticidas organoclorados e desenvolvimento cognitivo em crianças e adolescentes residentes

em uma área contaminada no Brasil. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, 15: 105-120, **2015**.

CANEVAROLI, M. R.; LEMOS, E. G. M.; OLIVEIRA, K. M. P.; ISIQUE, W. Remoção de herbicida atrazina por meio de filtros de carvão ativado granular associados com microrganismos no tratamento de água para abastecimento. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, 26: 263 – 272, **2021**.

CARDOSO, D. A.; VALLE, E. M. A.; CODOGNOTO, L. Voltammetric studies of the interaction between lead metal ion and the methyl parathion pesticide. *J. Solid State Electrochem.*, 22: 1549 – 1555, **2018**.

CAVAS, T. In vivo genotoxicity evaluation of atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the cornet assay. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 1431 – 1435, **2011**.

CD, COMMISSION DECISION. *Implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results - 2002/657/EC*. Official Journal of the European Communities, 2002, disponível em: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/ed928116-a955-4a84-b10a-cf7a82bad858/language-en>, acessada em abril 2019.

CECÍLIA, V. Resistência e controle do carrapato-do-boi. *Instituto de Zootecnia*, 1: 13 – 19, **2015**.

CHARGUI, I.; GRISSA, I.; BENSASSI, F.; HRIRA, M. Y.; HAOUEM, S.; HAOUAS, Z.; BENCHEIKH, H. Oxidative stress, biochemical and histopathological alterations in the liver and kidney of female rats exposed to low doses of deltamethrin (DM): A molecular assessment. *Biomedical and Environmental Sciences*, 25: 672, **2012**.

CHEN, J.; ZHAO, W.; LIU, W.; ZHOU, Z.; YANG, M. Cloud point extraction coupled with derivative of carbofuran as a preconcentration step prior to HPLC. *Food Chem.*, 115: 1038 – 1041, **2009**.

COLEONE, C. C. “Avaliação da dissipação do inseticida malation utilizado em nebulização a ultrabaixo volume no controle da dengue: avaliação ecotoxicológica e de risco ambiental”. São Paulo. Programa de Pós Graduação em Saúde Pública, USP, **2014**. Dissertação de Mestrado, 152 p.

CONWAY, Gordon. *Produção de alimentos no século XXI: biotecnologia e meio ambiente*. São Paulo: Liberdade, 2003.

COSTA, B. E. S. “Extração Seletiva por Ponto Nuvem Para PréConcentração e Especificação de Arsênio Inorgânico em Matriz Alimentícia Empregando Espectrometria de Absorção Atômica Eletrotérmica em Forno de Grafite.” Catalão. Programa de Pós-Graduação em química UFG, **2013**. Dissertação Mestrado, 103p.

COSTA, A. I. G.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; DE ASSIS, R. C.; DOS SOARES, C. E. S.; DA SILVA, A. A.; D’ANTONINO, L.; DE OLIVEIRA, A. F.; BELLATO, C. R. Mobility and persistence of the herbicide fomesafen in soils cultivated with bean plants using SLE/LTP and HPLC/DAD. *Environmental Science and Pollution Research*, 22: 3457–3466, **2015**.

COSTA, A. I. G.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES. A. A.; SOUSA, F. A.; ZAMBOLIM, L. Determination of pesticides in lettuce using solid–liquid extraction with low temperature partitioning. *Food Chemistry*, 181: 64 – 71, **2015**.

DAS, S.; SINGHA, D.; SAHA, S.; KUMAR, M.; BHATTACHARYYA, A.; ROY, S. Multiresidue Method for GC-MS Amenable Multiclass Pesticides in Pineapple Fruit. *Pestic. Res. J.*, 31: 102 – 113, **2019**.

DOQ-CGCRE-008-Rev.07-Jul/18. *Orientação sobre validação de métodos analíticos*. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia-INMETRO, 2017, disponível em: http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganis%20mo=CalibEnsaio, acessada em janeiro 2019.

DOW AGROSCIENCE. *Toxological properties of chlorpyrifos*. Disponível em: <<http://www.dowagro.com/webapps/li/litorder.asp?filepath=chlorp/pdfs/noreg/010-90067.pdf&pdf=true>>. Acesso em mar.2020.

DOW AGROSCIENCE. *Physical/chemical properties*. Disponível em: <<http://www.dowagro.com/chlorp/science/pro.htm>>. Acesso em mar. 2020.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Normas gerais sobre o uso de agrotóxicos*. 2004, disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/407676/normas-gerais-sobre-o-uso-de-agrotoxicos>, acessada em julho 2019.

EPA. US *Environmental Protection Agency*. *Basic information about pesticide ingredients*. 2019, disponível em: <https://www.epa.gov/pesticides>, acessado em dezembro 2019.

ESCALEIRA, L. A. “Extração e pré-concentração no ponto nuvem para determinação de metais em águas salinas por espectrometria de emissão ótica com fonte de plasma indutivamente acoplado.” Niterói. Programa de Pós-Graduação em Geociências da Universidade Federal Fluminense, **2005**. Dissertação de Mestrado, 101p.

EDWARDS, F. L.; TCHOUNWOU, P. B. Environmental research and public health environmental toxicology and health effects associated with methyl parathion exposure – a scientific review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2: 430 – 441, **2005**.

EUROPEAN REGULATION 396/2005 and of the Council on maximum residue levels (MRLs) of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC, <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2005R0396:20121026:EN:PDF>, accessed 17 August 2020.

EZZI, L.; HAOUAS, Z.; SALAH, I. B.; SAKLY, A.; GRISSA, I.; CHAKROUN, S.; CHEIKH, H. B. Toxicopathic changes and genotoxic effects in liver of rat following exposure to diazinon. *Environmental Science and Pollution Research*, 23: 11163-11170, **2016**.

FACCO, J. F.; MARTINS, M. L.; BERNARDI, G.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Optimization and validation of a multiresidue method for pesticide determination in maize using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal. Methods*, 7: 359 – 371, **2015**.

FAN, X.; SONG, F. Bioremediation of atrazine: recente advances and promises. *Journal of Soils and Sediments*, 14: 1727 – 1737, **2014**.

FARAJZADEH, M. A.; MOGADDAM, M. R.; AGHDAM, S. R.; NOURI, N.; BAMORROWAT, M. Application of elevated temperature-dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organophosphorus pesticides residues in aqueous samples followed by gas chromatography-flame ionization detection. *Food Chem*, 212:198-204, **2016**.

FARGHALY, M. F. M.; ZAYED, S. M. A. D.; SOLIMAN, S. M. Deltamethrin degradation and effects on soil microbial activity. *Journal of Environmental Science and Health Part. B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 48: 575-581, **2013**.

FARINA, Y.; ABDULLAH, M. P.; BIBI, N.; KHALIK, W. M. A. W. M. Determination of pesticide residues in leafy vegetables at parts per billion levels by a chemometric study using GC-ECD in Cameron Highlands, Malaysia. *Food Chemistry*, 224: 55-61, **2017**.

FENIK, J.; TANKIEWICZ, M.; BIZIUK, M. Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30: 814 – 826, **2011**.

FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. *Chromatographic - mass spectrometry food analysis for trace determination of pesticide residues*. Amsterdam: Elsevier; 2005. 510 p.

FISCHER, A. K. “Efeitos adversos do inseticida malation sobre peixes”. Foz do Iguaçu. Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, 2021. Monografia, 90p.

FREITAS, S. S.; SERAFIM, F. A. T.; LANÇAS, F. M. Determination of target pesticide residues in tropical fruits employing matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction followed by high resolution gas chromatography . *J. Braz. Chem. Soc.*, 29: 1140 - 1148, **2018**.

FREITAS, J. M.; OLIVEIRA, T. C.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Boron doped diamond electrodes in flow-based systems. *Front. Chem.*, 7: 1–21, **2019**.

FU, F.; XIAO, L.; WANG, W.; XU, X.; XU, L.; QI, G.; CHEN, G. Study on the degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic sodium (MCPA sodium) in natural agricultural soils of Fuzhou, China using capillary electrophoresis. *Sci. Total Environ.*, 6: 1998-2003, **2009**.

FU, J.; TAN, X. H.; LI, Y. H.; SONG, X. J. A nanosilica/exfoliated graphene composite film-modified electrode for sensitive detection of methyl parathion. *Chinese Chem. Lett.*, 27: 1541 – 1546, **2016**.

GAO, N.; HE, C.; MA, M.; CAI, Z.; ZHOU, Y.; CHANG, G.; WANG, X.; HE, Y. Electrochemical co-deposition synthesis of Au-ZrO₂-graphene nanocomposite for a nonenzymatic methyl parathion sensor. *Anal. Chim. Acta.*, 1072: 25 – 34, **2019**.

GAO, X.; GAO, Y.; BIAN, C.; MA, H.; LIU, H. Electroactive nanoporous gold driven electrochemical sensor for the simultaneous detection of carbendazim and methyl parathion. *Electrochim. Acta.*, 310: 78, **2019**.

GARBELLINI, G. S.; SALAZAR-BANDA, G. R.; AVACA, L. A. Sonovoltammetric determination of toxic compounds in vegetables and fruits using diamond electrodes. *Food Chem.*, 116: 1029, **2009**.

GAWEŁ, M.; KILJANEK, T.; NIEWIADOWSKA, A.; SEMENIUK, S.; GOLISZEK, M.; BUREK, O.; POSYNIK, A. Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide residues in honey by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 282: 36-47, **2019**.

GERENT, G. G.; SPINELLI, A.; Environmentally-friendly *in situ* plated bismuth-film electrode for the quantification of the endocrine disruptor parathion in skimmed milk. *J. Hazard. Mater.*, 308, 157 – 163, **2016**.

GLEMBIN, P.; RACHEVA, R.; KERNER, M.; SMIRNOVA, I. Micelle mediated extraction of fatty acids from microalgae cultures: Implementation for outdoor cultivation. *Sep. Purif. Technol.*, 135: 127 – 134, **2014**.

GOMES, W. “Uso de inseticida (organofosforado) no combate à dengue e os possíveis danos à saúde pública na área urbana de Foz do Iguaçu-PR”. Paraná. Pós-Graduação em Gestão Ambiental em Municípios, UFPR, **2014**. Monografia, 42p.

GONÇALVES-FILHO, D.; SILVA, C. C. G.; DE SOUZA, D. Pesticides determination in foods and natural waters using solid amalgam-based electrodes: challenges and trends. *Talanta*, 212: 120756, **2020**.

GONG, J.; WANG, L.; ZHANG, L. Electrochemical biosensing of methyl parathion pesticide based on acetylcholinesterase immobilized onto Au–polypyrrole interlaced network-like nanocomposite. *Biosens. Bioelectron.*, 24: 2285 – 2288, **2009**.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. A.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; BORGES-MIQUEL, T. M.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. Determination of organophosphorus pesticides and metabolites in cereal-based baby foods and wheat flour by means of ultrasound-assisted extraction and hollow-fiber liquid-phase microextraction prior to gas chromatography with nitrogen phosphorus detection. *J Chromatogr A*, 1313: 166 – 174, **2013**.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á.; SOCAS-RODRÍGUEZ, B.; HERRERA-HERRERA, A. V.; GONZÁLEZ-SÁLAMO, J.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. Á. Evolution and applications of the QuEChERS method. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 71: 169 – 185, **2015**.

GOULART, S. M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, J. H. Lowtemperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. *Talanta*, v. 75, n. 5, p. 1320-1323, 2008.

GOUVEIA-CARIDADE, C.; BRETT, C. M. A. The influence of Triton X-100 surfactant on the electroanalyses of lead and cadmium at carbono film eletctrodes – an electrochemical impedance study. *J. Electroanal. Chem.*, 592: 113–120, **2006**.

GOVINDASAMY, M.; MANI, V.; CHEN, S. M.; CHEN, T. W.; SUNDRAMOORTHY, A. K. Methyl parathion detection in vegetables and fruits using silver@ graphene nanoribbons nanocomposite modified screen printed electrode. *Sci. Rep.*, 7: 46471, **2017**.

GRIGG, D. B. *Green Revolution*. International Encyclopedia of the Social e Behavioral Sciences, 2001.

GRÜTZMACHER, D. D.; GRÜTZMACHER, A. D.; AGOSTINETTO, D.; LOECK, A. E.; ROMAN, R.; PEIXOTO, S. C.; ZANELLA, R. Monitoring of pesticides in two water sources in southern Brazil. *Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.* 12: 632 - 637, **2008**.

GU, C.; WANG, Q.; ZHANG, L.; YANG, P.; XIE, Y.; FEI, J. Ultrasensitive non-enzymatic pesticide electrochemical sensor based on HKUST-1-derived copper oxide @ mesoporous carbon composite. *Sens. Actuators, B*, 305: 127478, **2020**.

HADICHEGENI, S.; GOLIAEI, B.; TAGHIZADEH, M.; DAVOODMANESH, S.; TAGHAVI, F.; HASHEMI, M. Characterization of the interaction between human serum albumin and diazinon via spectroscopic and molecular docking methods. *Human & experimental toxicology*, 37: 959-971, **2018**.

HERNÁNDEZ-BORGES, J.; CABRERA, J.C.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A.; HERNÁNDEZ-SUAREZ, E. M.; SAÚCO, V. G. Analysis of pesticide residues in bananas harvested in the Canary Islands (Spain). *Food Chemistry*, 113:313 – 319, **2009**.

HERTWING, K.V. *Manual de herbicidas, desfolhantes, dessecantes, fitoreguladores e bioestimulantes*. São Paulo: Agronômica Ceres, 1983. 670p.

HINZE, W. L.; PRAMAURO, E. A Critical Review of Surfactant-Mediated Phase Separations (Cloud-Point Extractions): Theory and Applications. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 24: 133 – 177, **1993**.

HORTELLANI, M. A.; SARKIS, J. E. S.; ABESSA, D. M. S.; SOUSA, E. C. P. M. Avaliação da contaminação por elementos metálicos dos sedimentos do Estuário Santos-São Vicente. *Química Nova*, 31: 10 – 15, **2008**.

HRASTNIK, N. I.; JOVANOVSKI, V.; HOĆEVAR, S. B. In-situ prepared copper film electrode for adsorptive stripping voltammetric detection of trace Ni(II). *Sens. Actuators, B*, 307: 127637, **2020**.

HU, Y. Simultaneous determination of phenylurea herbicides in yam by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 986: 143 – 148, **2015**.

IRANI MUKHERJEE. Determination of Pesticide Residues in Honey Samples. *Bull Environ Contam Toxicol*, 83: 818–821, **2009**.

JALLOW, M. F. A.; AWADH, D. G.; ALBAHO, M. S.; DEVI, V. Y.; AHMAD, N. Monitoring of Pesticide Residues in Commonly Used Fruits and Vegetables in Kuwait. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 14: 833 – 846, **2017**.

JIN, H.; LIU, Y.; WEI, M. Determination of Organophosphorus Pesticides Based on BDD Electrode Modified with Au/chitosan Fiber. *J. Chinese Chem. Soc.*, 60: 297 – 310, **2013**.

JOBIM, P. F. C.; NUNES, L. N.; GIUGLIANI R.; CRUZ, I. B. M. Existe uma associação entre mortalidade por câncer e uso de agrotóxicos? Uma contribuição ao debate. *Ciênc. Saúde Colet.*,15: 277-288, **2010**.

JOINT FAO/WHO. *Meeting on Pesticide Residues*, Geneva, 2011.

JUHLER, R. K. Optimized method for the determination of organophosphorus pesticides in meat and fatty matrices. *Journal of Chromatography A.*, 786: 145 – 153, **1997**.

KAREL, N.; IRENA, N. Determination of Critical Micelle Concentration by Electrochemical Means. *Analytical Letters*, 39: 1023 – 1040, **2006**.

KASA, N. A.; SEL, S.; CHORMEY, D. S.; BAKIRDERE, S. *Meas. J. Int. Meas. Confed.*, **2019**, 147, 106841–106846.

KATSUDA, Y. Progress and future of pyrethroids. In: MATSUO, N.; MORI, T. (Ed.). *Pyrethroids*. Berlin: Springer, 2012, p. 30.

KHAIRY, M.; AYOUB, H. A.; BANKS, C. E. Non-enzymatic electrochemical platform for parathion pesticide sensing based on nanometer-sized nickel oxide modified screen-printed electrodes. *Food Chem.*, 255: 104 – 111, **2018**.

KOJRO, G.; RUDZKI, P. J.; PISKLAK, D. M.; GIEBUŁTOWICZ, J. Matrix effect screening for cloud-point extraction combined with liquid chromatography coupled to mass spectrometry: Bioanalysis of pharmaceuticals. *J. Chromatogr. A*, 1591: 44–54, **2019**.

KONATU, R. B.; BREITKREITZ, F. M. C.; JARDIM, I. C. Revisiting quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe parameters for sample preparation in pesticide residue analysis of lettuce by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1482, 11-22, **2017**.

KOWALCZE, M.; JAKUBOWSKA, M. Voltammetric determination of thujone in herbal matrices in the presence of Triton X-100. *Anal. Biochem.*, 543: 12–20, **2018**.

KUMAR, J.; D'SOUZA, S. F. Microbial biosensors for methyl parahion detection. *Biosens. Bioelectron.*, 26: 4289–4293, **2011**.

KUMAR, T. H. V.; SUNDRAMOORTHY, A. K. Electrochemical biosensor for methyl

parathion based on single-walled carbon nanotube/glutaraldehyde crosslinked acetylcholinesterase wrapped bovine serum albumin nanocomposites. *Anal. Chim. Acta.*, 1074: 131, **2019**.

KUZMANOVIĆ, D.; KHAN, M.; MEHMETI, E.; NAZIR, R.; AMAIZAH, N. R. R.; STANKOVIĆ, D. M. Determination of pyridoxine (vitamin B6) in pharmaceuticals and urine samples using unmodified boron-doped diamond electrode. *Diam. Relat. Mater.*, 64: 184 – 189, **2016**.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE**. Campinas: Editora Átomo, 2009.

LASKOWSKI, D.A. Physical and chemical properties of pyrethroids. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 174: 49 - 170. **2002**.

LAWAL, A.; WONG, R. C. S.; TAN, G. H.; ABDULRA'UF, L. B. Determination of Pesticide Residues in Fruit and Vegetables by High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry with Multivariate Response Surface Methodology. *Anal. Lett.*, 52: 231- 248, **2019**.

LEHOTAY, S. Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 90: 485 – 520, **2007**.

LEHOTAY, S. J. QuEChERS sample preparation approach for mass spectrometric analysis of pesticide residues in foods. *Mass Spectrometry in Food Safety*. 747: 65 – 91, **2011**.

LEHOTAY, S. J.; MAŠTOVSKÁ, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *J. AOAC Int.*, 88: 615 – 629, **2005**.

LI, B. B.; YUAN, Z. F. Non-linear and chaos characteristics of heart sound time series. *Proc Inst Mech Eng H.*, 222: 265-72, **2008**.

LI, Z.; LI, Y.; LIU, X.; LI, X.; PAN, C. Multiresidue analysis of 58 pesticides in bean products by disposable pipet extraction (DPX) cleanup and gas chromatography-mass spectrometry determination. *J. Agric. Food Chem.*, 60: 4788 – 4798, **2012**.

LI, Y.; XU, M.; LI, P.; DONG, J.; AI, S. Nonenzymatic sensing of methyl parathion based on graphene/gadolinium Prussian Blue analogue nanocomposite modified glassy carbon electrode. *Anal. Methods*, 6: 2157–2162, **2014**.

LIANG, P.; PENG, L.; YAN, P. Speciation of As(III) and As(V) in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction separation and determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Microchimica Acta*, 166: 47 – 52, **2009**.

LIU, W.; HU, Y.; ZHAO, J.; XU, Y.; GUAN, Y. Determination of organophosphorus pesticides in cucumber and potato by stir bar sorptive extraction. *J. Chromatogr. A*, 1095: 1 – 7, **2005**.

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

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida** – Rio de Janeiro: AS – PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.

LÓPEZ-MAYÁN, J. J.; CERNEIRA-TEMPERÁN, B.; PEÑA-VÁZQUEZ, E.; BARCIELA-ALONSO, M. C.; DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, M. R.; BERMEJO-BARRERA, P. Evaluation of a cloud point extraction method for the preconcentration and quantification of silver nanoparticles in water samples by ETAAS. *Int J Environ Anal Chem.*, 98: 1434 – 1447, **2018**.

LOSANO, N. F. “Efeitos da exposição ao inseticida deltametrina em morcegos frugívoros”. Viçosa. Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, UFV, **2015**. Dissertação de mestrado, 42p.

LOURENCAO, B. C.; BROCCENSKI, R. F.; MEDEIROS, R. A.; FATIBELLO-FILHO, O.; ROCHA-FILHO, R. C. Analytical applications of electrochemically pretreated boron-doped diamond electrodes. *ChemElectroChem*, 7: 1291–1311, **2020**.

LU, Y.; LIANG, X.; NIYUNGEKO, C.; ZHOU, J.; XU, J.; TIAN, G. A review of the identification and detection of heavy metal ions in the environment by voltammetry. *Talanta*, 178: 324–338, **2018**.

LUO, X.; HONG, J.; ZHENG, H.; QIN, J.; WANG, M.; YANG, B. A rapid synergistic cloud point extraction for nine alkylphenols in water using high performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Chromatogr. A.*, 1611: 460606, **2019**.

MACHADO, I.; GÉREZ, N.; PISTÓN, M.; HEINZEN, H.; CESIO, M. V. Determination of pesticide residues in globe artichoke leaves and fruits by GC-MS and LC-MS/MS using the same QuEChERS procedure. *Food Chem*, 227: 227 – 236, **2017**.

MAGALHÃES, E. J. “Desenvolvimento de métodos para quantificação de drogas em matrizes de interesse forense”. Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em química, UFMG, **2012**. Tese de Doutorado, 152 p.

MANAVALAN, S.; VEERAKUMAR, P.; CHEN, S. M.; LIN, K. C. Three – dimensional zinc oxide nanostars anchored on graphene oxide for voltammetric determination of methyl parathion. *Microchim. Acta*, 187: 17, **2020**.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. *Química Nova*, 24: 87-93, **2001**.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Manual de garantia da qualidade analítica - Resíduos e contaminantes em alimentos*. 2011, disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/manualde-garantia-qualidade-analitica.pdf>, acessada em setembro 2019.

MARÍN, J.; CAMPILLO, N.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M.; GARRIDO, I.; FENOLL, J.; VINAS, P. Liquid–liquid microextraction of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid for the analysis of agricultural samples by liquid chromatography. *Anal. Methods*, 12: 2039–2045, **2020**.

MARTÍNEZ VIDAL, J. L.; PLAZA-BOLANOS, P.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A. G. Determination of pesticide transformation products: a review of extraction and detection methods. *J Chromatogr A*, 1216: 6767 – 6788, **2009**.

MARTINS, M. S.; MACULAN, L. S.; PANDOLFO, A.; REINEHR, R.; ROJAS, J. W. J.; PANDOLFO, L. M.; KUREK, J. *Segurança do trabalho: estudos de casos nas áreas agrícola, ambiental, construção civil, elétrica, saúde*. SGE, p. 174, 2010, disponível em: http://www.protecao.com.br/upload/protecao_materiaarquivo/264.pdf, acessada em outubro 2019.

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. *Herbicidas em Alimentos: aspectos gerais, toxicológicos e analíticos*. São Paulo: Livraria Varela; 1997. 108 p.

MOREIRA, P.; SIMÕES, P.; DORES, V.; STRUSSMANN, M. Contaminação de águas superficiais e de chuva por agrotóxicos em uma região de Mato Grosso. *Ciência & Saúde Coletiva*. 17: 1557-1568, **2012**.

MORTADA, W. I.; HASSANIEN, M. M.; EL-ASMY, A. A. Cloud point extraction of some precious metals using Triton X-114 and a thioamide derivative with a salting-out effect. *Egypt. J. Basic Appl. Sci.*, 1: 184 – 191, **2014**.

MRZLIKAR, M.; HEATH, D.; HEATH, E.; MARKELJ, J.; BOROVSŠAK, A. K.; PROSEN, H. Investigation of neonicotinoid pesticides in Slovenian honey by LC-MS/MS. *LWT. Food Science and Technology*, 104: 45-52, **2019**.

MUKHERJEE, P.; PADHAN, S.K.; DASH, S.; PATEL, S.; MISHRA, B.K. Clouding behaviour in surfactant systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 162: 59 – 79, **2011**.

MUSUMECI, M. R.; NAKAGAWA, L. E.; LUCHINI, L. C.; MATALLO, M. B.; ANDREA, M. M. de. Degradação do diuron-14C em solo e em plantas de cana-de-açúcar (*saccharum* spp). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 30: 775- 778, **1995**.

NAJI, A. R.; HEIDARIAN, E.; GHATREH-SAMANI, K. Evaluation of the effects of the hydroalcoholic extract of *Terminalia chebula* fruit on diazinon-induced liver toxicity and oxidative stress in rats. *Avicenna journal of phytomedicine*, 7: 454, **2017**.

NORMATIVE INSTRUCTION N^o. 5, 2019 – Ministry of Agriculture, Livestock, and Supply (MAPA), <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-econtaminantes/InstruoNormativaN05.2019PNCRC2019.pdf>, accessed 17 August 2020.

OKUMURA, L. L.; SACZK, A.; OLIVEIRA, M. F. Electrochemical Feasibility Study of Methyl Parathion Determination on Graphite-Modified Basal Plane Pyrolytic Graphite Electrode. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22 :652-659, **2011**.

OLIVEIRA, C. L. “Estudo de esteróis como marcadores químicos em águas destinadas ao abastecimento público na região do Rio Paraíba do Sul, SP. Desenvolvimento e validação da metodologia analítica”. São Paulo. Programa de Pós Graduação em Ciências, USP, **2012**. Dissertação de Mestrado, 189p.

OLIVEIRA, P. R.; KALINKE, C.; GOGOLA, J. L.; MANGRICH, A. S.; JUNIOR, L. H. M.; BERGAMINI, M. F. The use of activated biochar for development of a sensitive electrochemical sensor for determination of methyl parathion. *J. Electroanal. Chem.*, 799: 602–608, **2017**.

ORSO, D.; MARTINS, M. L.; DONATO, F.F.; RIZZETTI, T. M.; KEMMERICH, M.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Multiresidue determination of pesticide residues in honey by modified QuEChERS method and gas chromatography with electron capture detection. *J. Braz. Chem. Soc.*, 25: 1355-1364, **2014**.

PALEOLOGOS, E. K.; GIOKAS, D. L.; KARAYANNIS, M. I. Micelle – mediated separation na cloud-point extraction. *Trendes in Analytical Chemistry*, 24: 426 -436, **2005**.

PARAMASIVAM, M.; CHANDRASEKARAN, S. Determination of fipronil and its major metabolites in vegetables, fruit and soil using QuEChERS and gas chromatography-mass spectrometry. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 93: 1203 – 1211, **2013**.

PARHAM, H.; RAHBAR, N. Square wave voltammetric determination of methyl parathion using ZrO₂-nanoparticles modified carbon paste electrode. *J. Hazard. Mater.*, 177: 1077–1084, **2010**.

PATUSSI, C.; BUNDCHEN, M. Avaliação in situ da genotoxicidade de triazinas utilizando o bioensaio Trad-SHM de Tradescantia clone 4430. *Ciênc. saúde coletiva Rio de Janeiro*, 18: 1173-1178, **2013**.

PAYÁ, P.; ANASTASSIADES, M.; MACK, D.; SIGALOVA, I.; TASDELEN, B.; OLIVA, J.; BARBA, A. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Anal. Bional. Chem.*, 389: 1697-1714, **2007**.

PEDROSA, V. A.; MIWA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. On the Utilization of Boron Doped Diamond Electrode as a Sensor for Parathion and as an Anode for Electrochemical Combustion Of Parathion. *Electroanalysis.*, 18: 1590, **2006**.

PERES F.; MOREIRA J. C. Saúde e ambiente em sua relação com o consumo de agrotóxicos em um pólo agrícola do Estado do Rio de Janeiro Brasil Health environment and pesticide use in a farming area in Rio de Janeiro State Brazil. *Cad. Saúde Pública*, 23: S612-S621, **2007**.

PETRONILHO E. D. C.; PINTO A. C.; FIGUEROA-VILLAR J. D. Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química. *Revista Militar de Ciência e Tecnologia*, 28: 1 – 12, 2011.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Matrix effect in pesticide quantification by gas chromatography. *Quím. Nova*, 32: 987 – 995, **2009**.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Optimization of the liquid–liquid extraction method and low temperature purification (LLE–LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. *Food Control*, 21: 1307 – 1311, **2010**.

PINTO, G. D. A. “Capacidade de degradação do agrotóxico clorpirifós por bactérias lácticas”. Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, UFRJ, **2017**. Dissertação de Mestrado, 62p.

POSE-JUAN, E.; CANCHO-GRANDE, B.; RIAL-OTERO, R.; SIMAL-GÁNDARA, J. The dissipation rates of cyprodinil, fludioxonil, procymidone and vinclozoline during storage of grape juice. *Food Control*, 17: 1012 – 1017, **2006**.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Quim. Nova*, 32: 1620 – 1634, **2009**.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. *Sci. Chromatogr.*, 3: 51 – 64, **2011**.

PUBCHEM, *National Center for Biotechnology Information*, 2019, disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, acessada em maio 2019.

QUERINO, A. C. L. *Intoxicações exógenas agudas por carbamatos organofosforados compostos biperidílicos e piretróides*. In: (Ed.). *Intoxicações exógenas agudas por carbamatos organofosforados compostos biperidílicos e piretróides*: CCIN, 2000.

QUINA, F. H.; HINZE, W. L. Surfactant-Mediated Cloud Point Extractions: Na Environmentally Bening Alternative Separation Approach. *Industrial Engineering Chemistry Research.*, 38: 4150-4168, **1999**.

RAFIQUE, N.; NAZIR, S.; AKRAM, S.; AHAD, K.; GOHAR, A.; ABBASI, S. T.; AHMED, I.; RAFIQUE, K. Screening of multiclass pesticide residues in honey by SPE-GC/MSD: a pilot study. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190: 666-676, **2018**.

RAMOS, L. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. *Journal of Chromatography A*, 1221: 84 – 98, **2012**.

RDC, RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA Nº 166, de 24 de Julho de 2017. *Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2017, disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>, acessada em janeiro 2019.

REBELO, A. M. “Desenvolvimento e validação de método analítico, via LC-ESI-MS/MS, para determinação de agrotóxicos em arroz irrigado (*Oryza sativa*, L.)”. Curitiba. Programa de Pós-Graduação em Química, UFPR, **2014**. Tese de Doutorado, 220 p.

REZENDE, H. C. “Pré- Concentração por extração em ponto nuvem para determinação de cádmio em amostras de bebidas por espectrometria de absorção atômica com forno tubular na chama e aerossol térmico. Uberlândia. Programa de Pós Graduação em Química, UFU, **2010**. Dissertação de Mestrado, 65p.

REICHERT, B.; NUNES, M. G. P.; PIZZUTTI, I. R.; COSTABEBER, I. H.; FONTANA, M. Z.; JÄNICH, B. D.; PANCIERA, M. P.; ARBUSTI, D.; CARDOSO, C. D.; CHIM, J. F. Pesticide residues determination in common bean using an optimized QuEChERS approach followed by solvent exchange and GC–MS/MS analysis. *J. Sci. Food Agric.*, 100: 2425 - 2434, **2020**.

REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chem.*, 13: 980 – 1010, **2015**.

REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. QuEChERS-based extraction with dispersive solid phase extraction clean-up using PSA and ZrO₂-based sorbents for determination of pesticides in bovine milk samples by HPLC-DAD. *Food Chem.*, 217: 225 – 233, **2017**.

RHOUATI, A.; MAJDINASAB, M.; HAYAT, A. A perspective on non-enzymatic electrochemical nanosensors for direct detection of pesticides. *Curr. Opin. Electrochem.*, 11: 12-18, **2018**.

RISSATO, S. R.; GALHIANE, M. S.; KNOLL, F. do R. N.; DE ANDRADE, R. M. B.; DE ALMEIDA, M. V. Método Multirresíduo para Monitoramento de Contaminação Ambiental de Pesticidas na Região de Bauru (SP) Usando Mel como Bio-Indicador. *Química Nova*, 29: 950–955, **2006**.

ROMANINI, C. A.; TEIXEIRA, A. B. Atendimento emergencial de intoxicação por piretróide em cão na clínica veterinária da FAI. *Revista OMNIA Saúde*, 5: 15-23, **2011**.

RUSINEK, C.A.; BANGE, A.; PAPAUTSKY, I.; HEINEMAN, W. R. Cloud Point Extraction for Electroanalysis: Anodic Stripping Voltammetry of Cadmium. *Anal. Chem.* 87: 6133 – 6140, **2015**.

SÁ, L. C. ; FERNANDES, V. C. ; CALHAU, C. ; DOMINGUES, V. F. ; MATOS, C. D. Determination of organochlorine pesticides in agricultural soils applying Quechers C-ECD and GC-MS/MS. *Revista de Ciências Agrárias (Portugal): Sociedade de Ciências Agrárias de Portugal*, 329-336, **2012**.

SANTE, Documento SANTE/11813/2017, *Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed*, 2017, disponível em: <http://www.eurlpesticides.eu>, acessada em Fevereiro 2020.

SAIDI, I.; MOUHOUCHE, F.; ABRI, H. Determination of pesticide residues on tomatoes from greenhouses in Boudouaou and Douaouda, Algeria. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 9: 207 – 212, **2017**.

SALAMZADEH, J.; SHAKOORI, A.; MORADI, V. Occurrence of multiclass pesticide residues in tomato samples collected from different markets of Iran. *J. Environ. Health Sci. Engineer.*, 16: 55 – 63, **2018**.

SALAZAR-BANDA, G. R.; ANDRADE, L. S.; NASCENTE, P. A. P.; PIZANI, P. S.; ROCHA-FILHO, R. C.; AVACA, L. A. The Changing Electrochemical Behaviour of Boron-Doped Diamond Surfaces with Time after Cathodic Pre-Treatments. *Electrochim. Acta.*, 51: 4612 – 4619, **2006**.

SALEMI, A.; RASOOLZADEH, R.; NEJAD, M. M.; VOSOUGH, M. Ultrasonic assisted headspace single drop micro-extraction and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detector for determination of organophosphorus pesticides in soil. *Anal Chim Acta*, 769: 121 – 126, **2013**.

SALER, S.; SAGLAN, N. Acute toxicity of Malathion on *Daphnia magna* Straus, 1820. *Journal of Biological Sciences*. 5: 297-299, **2005**.

SANDERSON, J. T.; SEINEM, W.; GIESY, J. P.; VAN DEN BERG, M. 2 – chloro – s – atrazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity?. *Toxicological Sciences*, 54: 121 – 127, **2000**.

SANNINO, A.; BOLZONI, L.; BANDINI, M. Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables. *J Chromatogr A*, 1036: 161- 169, **2004**.

SANTOS M. A. T. D.; AREAS M. A.; REYES F. G. R. Piretróides – uma visão geral. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 18: 339-349, **2008**.

SANTOS, M. S. “Teoria de micelização: propriedades de soluções de surfactantes via minimização da energia livre de gibbs”. Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, UFRJ, **2014**. Dissertação de Mestrado, 85 p.

SANZ, C. P.; HALKO, R.; FERRERA, Z. S.; RODRÍGUEZ, J. J. S. Micellar extraction of organophosphorus pesticides and their determination by liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 524: 265 – 270, **2004**.

SARAJI, M.; JAFARI, M.T.; MOSSADDEGH, M. Document details - Carbon nanotubes@silicon dioxide nanohybrids coating for solid-phase microextraction of organophosphorus pesticides followed by gas chromatography-corona discharge ion mobility spectrometric detection. *Journal of Chromatography A.*, 1429: 30 – 39, **2016**.

SARIDAL, K.; ULUSOY, H, I. A simple methodology based on cloud point extraction prior to HPLC-PDA analysis for tetracycline residues in food samples. *Microchem. J.*, 150: 104170, **2019**.

SATO, N.; MORI, M.; ITABASHI, H. Cloud point extraction of Cu (II) using a mixture of triton X-100 and dithizone with a salting-out effect and its application to visual determination. *Talanta.*, 117: 376 – 381, **2013**.

SCHENK, G.; MATEEN, I.; NG, T. K.; PEDROSO, M. M.; MITIĆ, N.; JAFELICCI Jr., M.; MARQUES, F. C. R.; GAHAN, L. R.; OLLIS, D. L. Organophosphate-degrading metallohydrolases: Structure and function of potent catalysts for applications in bioremediation. *Coordination Chemistry Reviews*, 317: 122-131, **2016**.

SEEBUNRUENG, K.; SANTALADCHAIYAKIT, Y.; SOISUNGNOEN, P.; SRIJARANAI, S. Catanionic surfactant ambient cloud point extraction and high-performance liquid chromatography for simultaneous analysis of organophosphorus pesticide residues in water and fruit juice samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, 401: 1707–1716, **2011**.

SENE, L.; CONVERTI, A.; SECCHI, G.; SECCHI, R.; SIMÃO, R. C. New aspects on atrazine biodegradation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53: 487–96, **2010**.

SHAMSIPUR, M.; YAZDANFAR, N.; GHAMBARIAN, M. Combination of solid-phase extraction with dispersive liquid–liquid microextraction followed by GC–MS for determination of pesticide residues from water, milk, honey and fruit juice. *Food Chemistry*, 204: 289 – 297, **2016**.

SILVA, E. P. “Validação de método de extração e análise de multirresíduo de agrotóxicos em carne bovina por cromatografia gasosa”. Viçosa. Programa de Pós Graduação em Agroquímica, UFV, **2008**. Dissertação de Mestrado, 102p.

SILVA, J.; MORAES, C. R.; HEUSER, V. D.; ANDRADE, V. M.; SILVA, F. R.; KVIKTO, K.; EMMEL, V.; ROHR, P.; BORDIN, D. L.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P.; ERDTMANN. Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. *Mutagenesis*, 23: 415-422 **2008**.

SINGH, M.; KASHYAP, H.; SINGH, P. K.; MAHATA, S.; RAI, V. K.; RAI, A. AuNPs/Neutral red-biofunctionalized graphene nanocomposite for nonenzymatic electrochemical detection of organophosphate via NO₂ reduction. *Sensors Actuators, B Chem.* 290: 195 – 202, **2019**.

SIQUEIRA, D. F.; MOURA, R. M.; CARNEIRO, G. E.; ARAUJO, J.; CRUZ, S. L. Análise da exposição de trabalhadores rurais a agrotóxicos. *Rev. Bras. Prom. Saúde.*, 26:182-191, **2013**.

SOARES, C. E. “Extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura e seu emprego na análise multirresíduos de agrotóxicos em uva e derivados”. Viçosa. Programa de Pós Graduação em Agroquímica, UFV, **2011**. Dissertação de Mestrado, 108p.

SOCAS-RODRÍGUEZ, B.; GONZÁLEZ-SÁLAMO, J.; HERNÁNDEZ BORGES, J.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. Recent applications of nanomaterials in food safety. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 96: 172–200, **2017**.

SONG, B.; CAO, W.; WANG, Y. A methyl parathion electrochemical sensor based on Nano-TiO₂, graphene composite film modified electrode. *Fullerenes Nanotub. Carbon Nanostructures.*, 24: 435, **2016**.

SONG, S.; ZHANG, C.; CHEN, Z.; HE, F.; WEI, J.; TAN, H. Simultaneous determination of neonicotinoid insecticides and insect growth regulators residues in honey using LC-MS/MS

with anion exchanger-disposable pipette extraction. *Journal of Chromatography A*, 1557: 51-61, **2018**.

SOUSA, G. V. “Comportamento no solo dos herbicidas diuron e hexazinone aplicados isolados e em mistura”. Viçosa. Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, UFV, 2016. Dissertação de Mestrado, **2016**, 68p.

SOUZA, A.; MEDEIROS, A. R.; SOUZA, A. C.; WINK, M.; SIQUEIRA, I. R.; FERREIRA, M. B. C.; FERNANDES, L.; HIDALGO, M. B. L.; TORRES, I. L. S. Avaliação do impacto da exposição a agrotóxicos sobre a saúde de população rural: Vale do Taquari, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciênc. Saúde Colet.*, 16: 3519-3528, **2011**.

SOUZA, A. P. F.; PETRARCA, M. H.; BRAGA, P. A. C.; RODRIGUES, N. R.; REYES, F. G. Analysis of insecticide residues in honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry using QuEChERS optimized by the Plackett Burman design, CyTA. *Journal of Food*, 19: 326-332, **2021**.

SQUISSATO, A. L.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Voltammetric determination of copper and tert-butylhydroquinone in biodiesel: A rapid quality control protocol. *Talanta*, 201, 433–440, **2019**.

STANKOVIĆ, D. M.; KALCHER, K. Amperometric quantification of the pesticide ziram at boron doped diamond electrodes using flow injection analysis. *Sensors Actuators, B Chem.*, 233: 144 – 147, **2016**.

STEFFEN, G. P. K. ; STEFFEN, R. B.; ANTONIOLLI, Z. I. Contaminação do solo e da água pelo uso de agrotóxicos. *Revista TECNOLÓGICA*, 15: 15- 21, **2011**.

STOYTICHEVA, M.; ZLATEV, R.; GOCHEV, V.; VELKOVA, Z.; MONTERO, G. Amperometric biosensor precision improvement: application to organophosphorus pesticide determination. *Anal. Methods*, 6: 8232–8238, **2014**.

SUFFREDINI, H. B.; PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L.; MACHADO, S. A. S.; ROCHA-FILHO, R. C.; AVACA, L. A. Enhanced Electrochemical Response of Boron-Doped Diamond Electrodes Brought on by a Cathodic Surface Pre-Treatment, *Electrochim. Acta.*, 49: 4021 – 4026, **2004**.

TADEO, J. L.; SÁNCHEZ-BRUNET, C.; ALBERO, B.; GARCÍA-VALCÁRCEL, A. I. Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. *Journal of Chromatography A.*, 1217: 2415 – 2440, **2010**.

TAYEB, W.; NAKBI, A.; CHERAIEF, I.; ABDELHEDI, M. Alteration of lipid status and lipid metabolism, induction of oxidative stress and lipid peroxidation by 2,4-Dichlorophenoxyacetic herbicide in rat liver. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 23: 449-458, **2013**.

TCHEUMI, H. L.; TONLE, I. K.; NGAMENI, E.; WALCARIUS, A. Electrochemical analysis of methylparathion pesticide by a gemini surfactant-intercalated clay-modified electrode. *Talanta.*, 81: 972 – 979, **2010**.

THIVYA, P.; RAMYA, R.; WILSON, J. Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/taurine biocomposite on screen printed electrode: Non-enzymatic cholesterol biosensor. *Microchem. J.*, 157: 105037, **2020**.

TIMOFEEVA, I.; SHISHOV, A. Y.; KANASHINA, D.; MAKEEVA, D. On-line in-syringe sugaring-out liquid-liquid extraction coupled with HPLC-MS/MS for the determination of pesticides in fruit and berry juices. *Talanta*, 167: 761 – 767, **2017**.

TINGLE, C. C. D.; ROTHER, J. A.; DEWHURST, C. F.; LAUER, S.; KING, W. J. *Health and enviromental effects of fipronil*. Disponível em: <http://www.pan-uk.org/archive/Publications/Briefing/fipronil.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2020.

TREZZI, M. M.; VIDAL, R. A.; MEROTTO, J. R. A. *Herbicidas inibidores da ALS*. *Herbicidologia*. Porto Alegre: Edição dos Autores. p. 152, 2001.

TSIAFOULIS, C. G.; NANOS, C. G. Determination of azinphos-methyl and parathion-methyl in honey by stripping voltammetry. *Electrochim. Acta.*, 56: 566 – 574, **2010**.

TUNESI, M. M.; KALWAR, N.; ABBAS, M. W.; KARAKUS, S.; SOOMRO, R. A.; KILISLIOGLU, A.; ABRO, M. I.; HALLAM, K. R. Functionalised CuO nanostructures for the detection of organophosphorus pesticides: A non-enzymatic inhibition approach coupled with nano-scale electrode engineering to improve electrode sensitivity. *Sensors Actuators, B Chem.*, 260: 480 – 489, **2018**.

VASILESCU, A.; MARTY, J. L. Electrochemical aptasensors for the assessment of food quality and safety. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 79: 60 - 70, **2016**.

VELASCO, L. O. M.; CAPANEMA, L. X. L. *O setor de agroquímicos*. BNDES Setorial, 24: 69-96, 2006.

VIEIRA, E.; LICHTIG, J. *Arquivos do Instituto Biológico. São Paulo*, 71, 1, **2004**.

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. *Química Nova*, 30: 535–540, **2007**.

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

XUE, R.; KANG, T. F.; LU, L. P.; CHENG, S. Y. Immobilization of acetylcholinesterase via biocompatible interface of silk fibroin for detection of organophosphate and carbamate pesticides. *Appl. Surf. Sci.*, 258: 6040 – 6045, **2012**.

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. *Electrochim. Acta.*, 116: 366 – 371, **2014**.

WAHEED, A.; MANSHA, M.; ULLAH, N. Nanomaterials-based electrochemical detection of heavy metals in water: Current status, challenges and future Direction. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 105: 37–51, **2018**.

WALORCZYK, S. Validation and use of a QuEChERS-based gas chromatographic-tandem mass spectrometric method for multiresidue pesticide analysis in blackcurrants including studies of matrix effects and estimation of measurement uncertainty. *Talanta*, 120: 106 – 113, **2014**.

WANG, Y.; YOU, J.; REN, R.; XIAO, Y.; GAO, S.; ZHANG, H.; YU, A. Determination of triazines in honey by dispersive liquid-liquid microextraction high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1217:4241-4246, **2010**.

WANG, Y.; XIAO, L.; CHENG, M. Determination of phenylureas herbicides in food stuffs based on matrix solid-phase dispersion extraction and capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. *J Chromatogr A*, 1218: 9115 – 9119, **2011**.

WANG, Z.; MA, B.; SHEN, C.; CHEONG, L. Z. Direct, selective and ultrasensitive electrochemical biosensing of methyl parathion in vegetables using Burkholderia cepacia lipase@MOF nanofibersbased biosensor. *Talanta*, 197: 356 – 362, **2019**.

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

WILKOWSKA, A.; BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chem.* 125, 803 – 812, **2011**.

WU, L.; HU, M.; LI, Z.; SONG, Y.; YU, C.; ZHANG, H.; YU, A.; MA, Q.; WANG, Z. Dynamic microwave-assisted extraction combined with continuous-flow microextraction for determination of pesticides in vegetables. *Food Chemistry*, 192: 596 – 602, **2016**.

YADZI, A. S.; Surfactant-based extraction methods. *Trends Environ. Anal. Chem.*, 30: 918 - 929, **2011**.

YANG, X.; YU, R.; ZHANG, S.; CAO, B.; LIU, Z.; LEI, L.; LI, N.; WANG, Z.; ZHANG, L.; ZHANG, H.; CHEN, Y. Aqueous two-phase extraction for determination of triazine herbicides in milk by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, 972: 111 – 116, **2014**.

YU, J.; HUANG, J.; LONG, F.; MA, A.; PAN J. “Inverse” cloud point extraction coupled with large volume injection ion-pair chromatography: A green route integrating extraction, challenging sample cleanup and on-column concentration into fast simple operation. *Talanta*, 190: 38-46, **2018**.

YUE, X.; HAN, P.; ZHU, W.; WANG, J.; ZHANG, L. Facile and sensitive electrochemical detection of methyl parathion based on a sensing platform constructed by the direct growth of carbon nanotubes on carbon paper. *RSC Adv.*, 6: 58771–58779, **2016**.

ZANELLA, R.; CALDAS, S.S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Química Nova*, 34: 1604 – 1617, **2011**.

ZENG, Y.; ZHU, Z.; DU, D.; LIN, Y. Nanomaterial-based electrochemical biosensors for food safety. *J. Electroanal. Chem.* 781, 147 – 154, **2016**.

ZENG, Y.; YU, D.; YU, Y.; ZHOU, T.; SHI, G. Differential pulse voltammetric determination of methyl parathion based on multiwalled carbon nanotubes-poly(acrylamide) nanocomposite film modified electrode. *J. Hazard. Mater.*, 217: 315–322, **2012**.

ZHANG, Y.; CAO, B.; JIANG, Z.; DONG, X.; HU, M.; WANG, Z. Metabolic ability and individual characteristics of an atrazine-degrading consortium DNC5. *Journal of Hazardous Materials*, 237: 376–381, **2012**.

ZHANG, W.; ASIRI, A. M.; LIU, D.; DU, D.; LIN, Y. Nanomaterial-based biosensors for environmental and biological monitoring of organophosphorus pesticides and nerve agents. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 54: 1 – 10, **2014**.

ZHANG, W.; LIU, C.; LIU, F.; ZOU, X.; XU, Y.; XU, X. A smart-phone-based electrochemical platform with programmable solid-state-microwave flow digestion for determination of heavy metals in liquid food. *Food Chem.*, 303: 125378–125384, **2020**.

ZHAO, W. J.; SUN, X. K.; DENG, X. N.; HUANG, L.; YANG, M. M.; ZHOU, Z. M. Cloud point extraction coupled with ultrasonic-assisted back-extraction for the determination of organophosphorous pesticides in concentrated fruit juice by gas chromatography with flame photometric detection. *Food Chem.*, 127: 683 – 687, **2011**.

ZHENG, C.; WANG, M.; WANG, Y.; HUANG, Z. Optimization of biosurfactant-mediated oil extraction from oil sludge. *Bioresource Technology*, 110: 338–342, **2012**.

ZHU, H. Z.; LIU, W.; MAO, J.W.; YANG, M. Cloud point extraction and determination of trace trichlorfon by high performance liquid chromatography with ultraviolet-detection based on its catalytic effect on benzidine oxidizing. *Anal. Chim. Acta.*, 614: 58 – 62, **2008**.

ZUHAIR, A. A. K.; SUHER, S. A. Cloud Point Extraction of Carbendazim Pesticide in Foods and Environmental Matrices Prior to Visible Spectrophotometric Determination. *Science Journal of Analytical Chemistry*, 4: 30 – 41, **2016**.