

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL CATALÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS EXATAS E
TECNOLÓGICAS

KAMILA PEREIRA DE AMORIM

**Extração por ponto nuvem do fungicida Carbendazim em
amostras de morango e detecção eletroquímica com eletrodo de
DDB**

Bolsista CAPES

CATALÃO – GO

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE FÍSICA

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

2. Nome completo do autor

KAMILA PEREIRA DE AMORIM

3. Título do trabalho

EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM DO FUNGICIDA CARBENDAZIM EM AMOSTRAS DE MORANGO E DETECÇÃO ELETROQUÍMICA COM ELETRODO DE DDB.

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 **Leonardo Santos Andrade, Professor do Magistério Superior**, em 01/09/2021, às 22:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **KAMILA PEREIRA DE AMORIM, Usuário Externo**, em



02/09/2021, às 11:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



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 **2320032** e o código CRC **E4E17383**.

KAMILA PEREIRA DE AMORIM

**Extração por ponto nuvem do fungicida Carbendazim
em amostras de morango e detecção eletroquímica com eletrodo
de DDB**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Federal de Goiás como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Exatas e Tecnológicas. Área de concentração: Metodologia da Ciência e Engenharia de Materiais.

Linha de pesquisa: Caracterização e Desenvolvimento de Moléculas e Materiais

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Santos Andrade

CATALÃO – GO

2021

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

De Amorim, Kamila Pereira

Extração por ponto nuvem do fungicida Carbendazim em amostras de morango e detecção eletroquímica com eletrodo de DDB [manuscrito] / Kamila Pereira De Amorim. - 2021.

98 f.

Orientador: Prof. Leonardo Santos Andrade.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade Acadêmica Especial de Física e Química, Catalão, Programa de Pós Graduação em Ciências Exatas e Tecnológicas, Catalão, 2021.

Apêndice.

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

1. Detecção eletroquímica. 2. Extração por ponto nuvem. 3. Eletrodo de diamante dopado com boro. 4. Carbendazim. 5. Morango. I. Andrade, Leonardo Santos, orient. II. Título.

CDU 544.6



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE FÍSICA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº 16 da sessão de Defesa de Tese de **KAMILA PEREIRA DE AMORIM** que confere o título de Doutora em **Ciências Exatas e Tecnológicas**, na área de concentração em **Metodologia da Ciência e Engenharia de Materiais**.

Aos **onze dias do mês de agosto de dois mil e vinte um**, a partir das **oito horas e trinta minutos**, na **sala virtual meet.google.com/uep-fzxw-han**, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “**EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM DO FUNGICIDA CARBENDAZIM EM AMOSTRAS DE MORANGO E DETECÇÃO ELETROQUÍMICA COM ELETRODO DE DDB**”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor **LEONARDO SANTOS ANDRADE (UFCAT)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor **Fábio Ruiz Simões (UNIFESP)**, membro titular externo; Professor Doutor **Gildiberto Mendonça de Oliveira (UFJ)**, membro titular externo; Professor Doutor **Eduardo Mathias Richter (UFU)**, membro titular externo; Professora Doutora **VANESSA NUNES ALVES (UFCAT)**, membro titular externo. Durante a arguição, os membros da banca **não** sugeriram alteração do título do **trabalho**. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamado o resultado pelo Professor Doutor **LEONARDO SANTOS ANDRADE**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **doze dias do mês de agosto de de dois mil e vinte um**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Santos Andrade, Professor do Magistério Superior**, em 12/08/2021, às 08:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Nunes Alves, Professor do Magistério Superior**, em 12/08/2021, às 22:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fábio Ruiz Simões, Usuário Externo**, em 13/08/2021, às 11:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Mathias Richter, Usuário Externo**, em 13/08/2021, às 12:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gildiberto Mendonça De Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 13/08/2021, às 15:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



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 **2273551** e o código CRC **DEF283DE**.

Referência: Processo nº 23070.039222/2021-27

SEI nº 2273551

*Dedico este trabalho aos meus filhos
Pedro Mancel e Mariana, meus
pais José e Ilda e meu marido
Claudio Roberto.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela dádiva da vida.

Ao Prof. Dr. Leonardo Santos Andrade, pela orientação, não apenas durante a realização deste trabalho, mas ao longo de mais de uma década, desde a graduação até aqui. Obrigada pela oportunidade, apoio, paciência, compreensão, ensinamentos, conselhos e alguns puxões de orelha.

Agradeço a todos os professores que participaram de minha formação.

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

A CAPES, pela bolsa concedida.

Ao prof. Dr. Eduardo Mathias Richter, por ter nos cedido a célula do BIA.

A prof. Dra. Sílvia de Sousa Freitas, por ter nos cedido valiosas amostras de pesticidas para análises iniciais.

Aos meus filhos Pedro Manoel e Mariana, vocês me inspiram a ser o melhor exemplo pessoal e profissional a cada dia.

Agradeço a meus pais José e Ilda, não tenho palavras para agradecê-los. Em especial a senhora mamãe, em sua companhia, a escrita desta tese foi muito mais prazerosa. Obrigada pelo zelo, cuidado, o café da tarde e seu exemplo de organização e resiliência.

Ao meu esposo, agradeço novamente, principalmente por me mostrar que posso superar os desafios e minhas limitações.

Ao Tio Dino, José Dionísio e Telma (padrinho e madrinha) pelo carinho e incentivo na busca dos meus objetivos.

À minha irmã Karina e meu cunhado Enivaldo, obrigada pelo carinho e incentivo.

A vovó Maria Rodrigues Canêdo, obrigada pela torcida e apoio.

Ao meu sogro, José Claudio, e meus cunhados Nayara, Danilo e Flavio Frederico, e em especial à Maria Cleonêdes (Neide), minha sogra, por ter cultivado e cedido as mudas de morango orgânico.

Meus sobrinhos Ana Carolina, João Neto e Lorenzo, os dias são mais doces com vocês!

Aos amigos que encontrei na UFCAT, Antônia, Gabriela, Lya, Larissa, Débora, Diego Cara, Amanda, Thiago, Larissa Ferreira, Kellen, Rívia, Andreia, Flávia, Monise, Márcia, Marina, Marcus, Jordana. Obrigada pelos momentos de descontração e apoio, e por discussões valiosas.

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

RESUMO

O método de extração por ponto nuvem (EPN) foi usado para a extração e pré-concentração do fungicida Carbendazim (CBZ) de amostras de morango comercial e a combinação entre as técnicas de detecção eletroquímica e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-EC) foi usada para a determinação do CBZ. Um eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) pré-tratado catodicamente foi usado como material de eletrodo. Os parâmetros cromatográficos otimizados resultaram em uma composição de fase móvel de KH_2PO_4 (0,01 mol L⁻¹; pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) vazão de 0,8 mL min⁻¹. Um potencial aplicado para a detecção eletroquímica de 1,4 V x Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹) foi selecionado a partir do voltamograma hidrodinâmico construído. A eficiência do processo de extração foi avaliada variando-se o pH das amostras de morango comercial, sendo o melhor resultado referente ao maior sinal de corrente do CBZ obtido em pH 7,0. As variáveis temperatura, tempo de banho ultrassônico, massa de NaCl e quantidade de surfactante foram investigadas por meio de Planejamento Fatorial 2⁴ e análise de composto central (CCD), sendo que as condições otimizadas foram: 40 °C, 15 min, 0,6 g de NaCl e 1 mL de 14% de Tergitol® (% v/v). Limites de detecção (LD, S/R = 3) e quantificação (LQ) de 0,156 µmol L⁻¹ e de 0,312 µmol L⁻¹, respectivamente, foram obtidos para o fungicida carbendazim sem o processo de EPN. Para os processos de EPN, considerando-se o valor do fator de pré-concentração (F_C) obtido (9,12), os valores de LD e LQ do CBZ em amostras de morango foram de 6,54 µg L⁻¹ (ou 34,2 nmol L⁻¹) e 13,1 µg L⁻¹ (ou 68,4 nmol L⁻¹), respectivamente. A validação do método foi feita a partir de ensaios de recuperação intra-dia e inter-dia, sendo avaliadas a exatidão, precisão e repetitividade. O método proposto foi aplicado em amostras de morango comercial de três estabelecimentos da cidade de Catalão-GO. Além disso, o método foi também aplicado visando avaliar diferentes métodos comumente utilizados nas residências do país para a lavagem do morango, sendo o mais eficiente observado com o uso de solução de bicarbonato de sódio 0,1% (m/v). A determinação eletroquímica de CBZ extraído de amostras de morango também foi realizada em um sistema de injeção por batelada (BIA, *Batch Injection Analysis*) e os resultados obtidos mostraram-se promissores (o ganho em sinal analítico comparado com HPLC-EC foi quase cem vezes maior). Entretanto algumas limitações foram encontradas em decorrência da presença de surfactante nas amostras analisadas, os quais, quando acumulados, resultaram na formação de bolhas/espuma no sistema.

Palavras chave: Extração por ponto nuvem, eletrodo de diamante dopado com boro, detecção eletroquímica, carbendazim, morango.

ABSTRACT

The cloud point extraction method (CPE) was used for the determination of the fungicide Carbendazim (CBZ) in commercial strawberry samples and the combination of electrochemical detection and high performance liquid chromatography (HPLC-EC) techniques was used for the determination of the extracted CBZ. A cathodically pre-treated boron doped diamond electrode (BDD) was used as the electrode material for all electrochemical determinations. The optimum chromatographic parameters resulted in a mobile phase composition of KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) flow rate of $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. The potential applied for the electrochemical detection of $1,4 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,00 \text{ mol L}^{-1} \text{KCl}$) was selected from the constructed hydrodynamic voltamogram, varying the potential between $1,0 \text{ V}$ and $1,45 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,00 \text{ mol L}^{-1} \text{KCl}$). The efficiency of the extraction process was made by varying the pH of the commercial strawberry samples in a range from 3,0 to 8,0, being the best result referring to the higher CBZ current signal obtained at pH 7,0. The variables temperature, ultrasonic bath time, mass of NaCl and amount of surfactant were investigated through Factor Planning 2^4 and central compound analysis (CCD), as the best conditions were: 40° C , 15 min, 0.6 g of NaCl and 1mL of 14% Tergitol® (% V / V). The LOD ($S / R = 3$) of $0.156 \mu\text{mol L}^{-1}$ and LOQ of $0.312 \mu\text{mol L}^{-1}$, were removed for the fungicide carbendazim without the EPN process. The LOD and LOQ values of CBZ in strawberries, converted using F_C (9.12) were $6.54 \mu\text{g L}^{-1}$ (34.2 nmol L^{-1}) and $13.1 \mu\text{g L}^{-1}$ (68.4 nmol L^{-1}), respectively. The validation of the method was carried out based on intra-day and inter-day recovery tests, with accuracy, precision and repeatability being evaluated. The proposed method was proposed in commercial strawberry of three criteria from the city of Catalão. In addition, the strawberry washing method was also tested, with 0.1% (w / v) sodium bicarbonate being more efficient. The electrochemical determination of CBZ extracted from strawberry samples was also performed using a batch injection system (BIA) and the results obtained proved to be promising (the gain in analytical signal compared to HPLC-EC was almost one hundred times greater). However, some limitations were found due to the presence of surfactant in the analyzed samples which when accumulated, resulted in the formation of bubbles/foam in the system.

Keywords: Cloud point extraction, boron doped diamond electrode, electrochemical detection, carbendazim, strawberry.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** -Distribuição das amostras analisadas segundo a presença ou a ausência de resíduos de agrotóxicos e o tipo de irregularidade.....17
- FIGURA 2** -Representação esquemática da extração por ponto nuvem 19
- FIGURA 3** - Representação esquemática da formação de um agregado micelar.....23
- FIGURA 4** -Estrutura química do Carbendazim 25
- FIGURA 5** - Fotografia (I) e representação esquemática (II) da célula eletroquímica convencional de três eletrodos: eletrodo de referência (ER), contra-eletrodo (CE) e eletrodo de trabalho (ET)34
- FIGURA 6** - Suporte de teflon para o eletrodo de trabalho (DDB): (a) suporte aberto mostrando o compartimento onde o eletrodo de trabalho é colocado (b) eletrodo de trabalho sendo colocado no suporte e (c) suporte fechado pronto para ser usado nas análises eletroquímicas..... 35
- FIGURA 7** - (I) Representação esquemática e (II) fotografia do sistema HPLC-EC usado para a detecção e quantificação do CBZ. W = Descarte; A e B = Frascos com fase móvel.....37
- FIGURA 8** - (I) Representação esquemática e (II) fotografia ilustrativa do sensor eletroquímico utilizado nas análises por HPLC-EC..... 38
- FIGURA 9** - Fotografias da colheita e cultivo do morango orgânico 39
- FIGURA 10** - (A) Esquema de uma célula de BIA e (B) fotografia da célula do BIA.....43
- FIGURA 11** - Esquema mostrando um procedimento de análise com o sistema BIA-DPV: (a) eletrodo de referência; (b) eletrodo auxiliar; (c) ponteira da micropipeta. Os estágios do procedimento são: (A) Etapa de condicionamento; (B) etapa de injeção; (C) aplicação da DPV; (D) sistema BIA-DPV pronto para uma nova injeção..... 44
- FIGURA 12** - (a) Voltamogramas cíclicos do CBZ ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e (b) Voltamogramas de pulso diferencial do CBZ ($5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$), Amplitude 50 mV; Escada de potencial 5,0 mV e tempo de intervalo de 0,1 s. Eletrólito suporte: KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$45
- FIGURA 13** - Efeito da variação do pH em relação aos potenciais e correntes de pico anódicos obtidos por SWV. Amplitude 50 mV, Escada de potencial 5,0 mV e tempo de intervalo de 0,1 s.....47
- FIGURA 14** – Mecanismo de oxidação do CBZ.....48
- FIGURA 15** - SWV com variação de amplitude. CBZ $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 10). Escada de potencial 5,0 mV e tempo de intervalo de 0,1 s.....49

FIGURA 16- SWV com variação de escada de potencial. CBZ 5,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em KH_2PO_4 (0,01 mol L^{-1} , pH 10,0). Amplitude 100,0 mV e tempo de intervalo de 0,1 s.....	50
FIGURA 17- Teste de repetitividade para a técnica de SWV. [CBZ] = 5,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em KH_2PO_4 (0,01 mol L^{-1} , pH 10), amplitude de 100 mV, escada de potencial de 8 mV ($\nu = 80 \text{ mV s}^{-1}$).....	51
FIGURA 18 - Voltamograma obtido referente à determinação do LD e LQ do CBZ. Eletrólito suporte: em KH_2PO_4 (0,01 mol L^{-1} , pH 10), amplitude de 100 mV, escada de potencial de 8 mV ($\nu = 80 \text{ mV s}^{-1}$).....	52
FIGURA 19- Curva analítica do CBZ obtida por SWV. Eletrólito suporte: KH_2PO_4 (0,01 mol L^{-1} , pH 10), amplitude de 100 mV, escada de potencial de 8 mV ($\nu = 80 \text{ mV s}^{-1}$).....	53
FIGURA 20 - Variação do sinal analítico do CBZ após a EPN com adição de 100 μL de CBZ (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) reconstituído na fase móvel, em diferentes composições de fase móvel e vazão. $E = 1,4 \text{ V x Ag/AgCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$. Volume de injeção = 20 μL	54
FIGURA 21 - Fotografia das alíquotas do sobrenadante da polpa de morango em diferentes pH.....	56
FIGURA 22 - Cronoamperogramas obtidos na determinação do CBZ ($C_a = 60 \mu\text{mol L}^{-1}$) em diferentes pH de amostra de morango. Eletrólito suporte: KH_2PO_4 (0,01 mol L^{-1} ; pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) vazão de 0,8 mL min^{-1} . $E = 1,4 \text{ V x Ag/AgCl } (3,0 \text{ mol L}^{-1})$. Volume de injeção = 20 μL	51
FIGURA 23 - Fotografia das alíquotas do sobrenadante da polpa de morango em diferentes pH após a EPN.....	57
FIGURA 24 - Voltamograma hidrodinâmico do CBZ extraído em amostras de morango pH 7. Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 (0,01 mol L^{-1} , pH 4,0)/ACN (75:25 V/V) vazão de 0,8 mL min^{-1} . Volume de injeção = 20 μL	58
FIGURA 25 - Gráfico de Pareto gerado no planejamento fatorial 2^4	60
FIGURA 26 - Fotografia das alíquotas do sobrenadante da polpa de morango em diferentes concentrações de surfactante após a EPN.....	61
FIGURA 27 - Plano obtido pela combinação das concentrações do NaCl e do Tergitol.....	62
FIGURA 28 - Gráfico gerado através do planejamento de composto central.....	63
FIGURA 29 - Variação do tempo de banho ultrassônico. pH 7. Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 (0,01 mol L^{-1} , pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) vazão de 0,8 mL min^{-1} . Volume de injeção = 20 μL	64
FIGURA 30 - Curva analítica obtida com e sem o procedimento de EPN. Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 (0,01 mol L^{-1} ; pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) vazão de 0,8 mL min^{-1} . $E = 1,4 \text{ V x Ag/AgCl } (3,0 \text{ mol L}^{-1})$. Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = 20 μL	65

FIGURA 31 - Cronoamperogramas do CBZ sem o procedimento de EPN. Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 (0,01 mol L^{-1} ; pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) vazão de 0,8 mL min^{-1} . $E = 1,4 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$ (3,0 mol L^{-1}). Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = 20 μL67

FIGURA 32 - Cronoamperogramas referente à EPN (condição otimizada), em morango comercial, na presença e ausência do interferente CPF. (a) - branco comercial; (b) - CBZ 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (c) - CPF 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (d) - CBZ 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ + CPF 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (e) - CBZ 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ + CPF 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 (0,01 mol L^{-1} ; pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) vazão de 0,8 mL min^{-1} . $E = 1,4 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$ (3,0 mol L^{-1}). Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = 20 μL71

FIGURA 33 - (a) Cronoamperogramas da EPN: (—) morango orgânico; (—) morango Comercial I; (—) morango Comercial I + CBZ ($C_{\text{ad}} = 5 \mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 (0,01 mol L^{-1} ; pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) vazão de 0,8 mL min^{-1} . $E = 1,4 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$ (3,0 mol L^{-1}). Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = 20 μL . (b) Região ampliada do sinal analítico do CBZ.....72

FIGURA 34 - (a) Cronoamperogramas da EPN: (—) morango orgânico; (—) morango Comercial II; (—) morango Comercial II + CBZ ($C_{\text{ad}} = 5 \mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 (0,01 mol L^{-1} ; pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) vazão de 0,8 mL min^{-1} . $E = 1,4 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$ (3,0 mol L^{-1}). Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = 20 μL . (b) Região ampliada do sinal analítico do CBZ.....73

FIGURA 35 - (a) Cronoamperogramas da EPN: (—) morango orgânico; (—) morango Comercial III; (—) morango Comercial III + CBZ ($C_{\text{ad}} = 5 \mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 (0,01 mol L^{-1} ; pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) vazão de 0,8 mL min^{-1} . $E = 1,4 \text{ V} \times \text{Ag/AgCl}$ (3,0 mol L^{-1}). Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = 20 μL . (b) Região ampliada do sinal analítico do CBZ.....73

FIGURA 36 - (a) Variação da velocidade de injeção (Volume de injeção = 50 μL) e (b) Variação do volume de injeção (Velocidade de injeção = 70 $\mu\text{L s}^{-1}$). [CBZ] = 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrólito: KH_2PO_4 (0,01 mol L^{-1} ; pH 10). Amplitude de 100 mV, escada de potencial de 8 mV ($\nu = 80 \text{ mV s}^{-1}$).....77

FIGURA 37 - Injeções das fases ricas em surfactante sem nenhuma diluição no sistema BIA-SWV. Condições otimizadas da EPN em morango orgânico não fortificado e fortificado (C_{ad} de CBZ = 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrólito: KH_2PO_4 (0,01 mol L^{-1} ; pH 10). Amplitude de 100 mV, escada de potencial de 8 mV ($\nu = 80 \text{ mV s}^{-1}$). Volume de injeção = 80 μL ; Velocidade de injeção = 70 $\mu\text{L s}^{-1}$79

FIGURA 38 - Injeções das fases ricas em surfactante diluídas em acetonitrila (1:1) no sistema BIA-SWV. Condições otimizadas da EPN em morango orgânico não fortificado e fortificado (C_{ad} de CBZ = 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrólito KH_2PO_4 (0,01 mol L^{-1} ; pH 10). Amplitude de 100 mV, escada de potencial de 8 mV ($\nu = 80 \text{ mV s}^{-1}$). Volume de injeção = 80 μL ; Velocidade de injeção = 70 $\mu\text{L s}^{-1}$80

FIGURA 39 - Injeções das fases ricas em surfactante diluídas em eletrólito (KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 10) (1:1) no sistema BIA- SWV. Condições otimizadas da EPN em morango orgânico não fortificado e fortificado (C_{ad} de CBZ = $10 \mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrólito KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 10). Amplitude = 100 mV, escada de potencial de 8 mV ($v = 80 \text{ mV s}^{-1}$). Volume de injeção = $80 \mu\text{L}$; Velocidade de injeção = $70 \mu\text{L s}^{-1}$81

FIGURA 40 - Teste de repetitividade ($n = 10$) para a técnica de BIA- SWV. Condições otimizadas da EPN em morango orgânico fortificado (C_{ad} de CBZ = $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$). Injeções das fases ricas em surfactante diluídas em eletrólito (KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 10) (1:1). Eletrólito: KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 10). Amplitude = 100 mV, escada de potencial de 8 mV ($v = 80 \text{ mV s}^{-1}$). Volume de injeção = $80 \mu\text{L}$; Velocidade de injeção = $70 \mu\text{L s}^{-1}$83

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Parâmetros dos surfactantes não iônicos utilizados em EPN. Adaptado pelo autor (WANG & DAI, 2010).....	22
TABELA 2 - Resultado do planejamento fatorial 2^4 para estudo da extração e pré-concentração por ponto nuvem do CBZ.....	59
TABELA 3 - ANOVA para o planejamento fatorial 2^4 no estudo da extração e pré-concentração por ponto nuvem do CBZ.....	59
TABELA 4 - Resultado do planejamento composto central (CCD) para estudo da extração e pré-concentração por ponto nuvem do CBZ.....	63
TABELA 5 - Limites de detecção e quantificação da literatura para CBZ em variadas matrizes e utilizando diferentes métodos de extração e análise	68
TABELA 6 - Eficiências de recuperação percentuais ($n = 5$), coeficientes de variação e t obtidos na determinação do CBZ em morango em 3 níveis de concentração. Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,4 \text{ V}$ x Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e $\text{pH}_{\text{morango}} 7,0$. Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$	69
TABELA 7 - Concentrações médias obtidas (C_{ob}) e eficiências de recuperação percentual ($R\%_{\text{média}}$) do CBZ ($n = 3$), em morango comercial, na presença e ausência do interferente CPF. Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) vazão de $0,8 \text{ mLmin}^{-1}$. $E = 1,4 \text{ V}$ x Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de DDB pré-tratadocatodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$	71
TABELA 8 - Concentrações médias obtidas (C_{ob}), assim como eficiências de recuperação percentual ($R\%_{\text{média}}$) do CBZ ($n=3$), em morango Comercial I, II e III. Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 ($0,01 \text{ molL}^{-1}$; pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) vazão de $0,8 \text{ mLmin}^{-1}$. $E = 1,4 \text{ V}$ x Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$	74
TABELA 9 - Concentrações médias obtidas (C_{ob}), assim como remoção percentual após ação de lavagem ($L\%_{\text{média}}$) do CBZ ($n = 3$). (a) água; (b) detergente comercial 1% (v/v); (c) bicarbonato de sódio 0,1% (p/v); (d) água sanitária 1% (v/v) de cloro ativo e (e) amostra não lavada. Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,4 \text{ V}$ x Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$	76
TABELA 10 - Correntes de pico anódica das amostras fortificadas com CBZ, provenientes de EPN e injetadas no sistema BIA- SWV e os respectivos CV% obtidos. Condições otimizadas da EPN em morango orgânico fortificado (C_{ad} de CBZ = $10 \mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrólito: KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 10). Amplitude = 100 mV , escada de potencial de 8 mV ($v = 80 \text{ mV s}^{-1}$). Volume de injeção = $80 \mu\text{L}$; Velocidade de injeção = $70 \mu\text{L s}^{-1}$	82

LISTAS DE ABREVIATURAS

ACN:	Acetonitrila
HPLC-EC:	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Eletroquímica
CMC:	Concentração Micelar Crítica
CV%:	Coefficiente de Variação
DDB:	Diamante Dopado com Boro
CBZ:	Carbendazim
d-SPE:	Extração em fase sólida dispersiva
EO:	Oxietileno
EPN:	Extração por Ponto Nuvem
Fc:	Fator de Pré-Concentração
F_D:	Fator de Diluição
GCE:	Eletrodo de carbono vítreo
HLB:	Hidrofílico-lipofílico
LD:	Limite de Detecção
LQ:	Limite de Quantificação
p.c.	Peso corporal
R%:	Recuperação percentual
TF:	Tampão Fosfato
TPN:	Temperatura de Ponto Nuvem
CV:	Voltametria cíclica
SWV:	Voltametria de Pulso Diferencial
ZMCPE:	Eletrodo de pasta de carbono modificado com zeólita termicamente ativada

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	16
1.1 - ASPECTOS GERAIS.....	16
1.2 - EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM (EPN)	18
1.2.1 - SURFACTANTES	21
1.2.2- FATOR DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO (F_c)	24
1.3- MORANGO.....	24
1.4- CARBENDAZIM.....	25
1.4.1 - DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DO CBZ	26
1.5- ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO (DDB)	27
1.6 - HPLC-EC	29
1.7 - BIA	30
CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS.....	33
CAPÍTULO 3 - PARTE EXPERIMENTAL	34
3.1-PRÉ-TRATAMENTO DO ELETRODO DE DDB.....	34
3.2 - VOLTAMETRIA CÍCLICA E VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL.....	34
3.2.1-LIMITE DE DETECÇÃO	36
3.2.2-LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	36
3.2.3-CURVA ANALÍTICA (SWV)	36
3.3-HPLC-EC	36
3.3.1-CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	36
3.4-MORANGO ORGÂNICO: PLANTAÇÃO E CULTIVO.....	39
3.5-EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM.....	39
3.5.1-VARIAÇÃO DO pH DA AMOSTRA	40
3.5.2-PLANEJAMENTO FATORIAL ²⁴ e CCD	41
3.6 - ESTUDO DE RECUPERAÇÃO: PRECISÃO E EXATIDÃO DO MÉTODO	41
3.7 - ESTUDO DE INTERFERENTE.....	41
3.8 - APLICAÇÃO DO MÉTODO	42
3.8.1 – AMOSTRAS COMERCIAIS.....	42

3.8.2 – TESTE DE LAVAGEM DE AMOSTRA COMERCIAL DE MORANGO CONTAMINADAS POR CBZ.....	42
3.9–SISTEMA <i>BIA-SWV</i>	43
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1 –VOLTAMOGRAMAS CÍCLICO E DE PULSO DIFERENCIAL	45
4.2- OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES SWV	48
4.2.1- AMPLITUDE E ESCADA DE POTENCIAL.....	48
4.2.2 - REPETITIVIDADE.....	50
4.2.2-LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO (SWV)	51
4.2.3-CURVA ANALÍTICA (SWV)	52
4.3.1 - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	53
4.4-EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM.....	55
4.4.1 - VARIAÇÃO DO pH DAS AMOSTRAS DE MORANGO	55
4.4.2 - VOLTAMOGRAMA HIDRODINÂMICO	57
4.5– OTIMIZAÇÃO DO PONTO NUVEM.....	58
4.6–CURVA DE CALIBRAÇÃO COM E SEM EPN: DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PRÉ- CONCENTRAÇÃO	65
4.7 – ESTUDO DE RECUPERAÇÃO: DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO E DA EXATIDÃO DO MÉTODO	68
4.8 – ESTUDO DE INTERFERENTE	70
4.9– APLICAÇÃO DO MÉTODO	72
4.9.1 – AMOSTRAS COMERCIAIS.....	72
4.9.2 – TESTE DE LAVAGEM DE AMOSTRA COMERCIAL DE MORANGO CONTAMINADAS POR CBZ.....	75
4.10 –SISTEMA <i>BIA-SWV</i>	76
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS	86
APÊNDICE A – Voltametrias cíclicas do CBZ e seus respectivos brancos com variação de pH	94

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - ASPECTOS GERAIS

Devido ao grande crescimento populacional e visando atender a demanda alimentícia, os pesticidas vêm sendo cada vez mais utilizados no setor da agricultura. Não há como imaginar a produção de alimentos sem o seu uso, pois tais produtos são responsáveis pelo controle de pragas e de doenças que afetam a produção, o processamento, o armazenamento, o transporte e a estocagem. Seu uso de forma irregular tem sido associado a doenças tais como disfunções no fígado, câncer, alterações neurológicas, caso a pessoa se contamine com os pesticidas (VOPHAM *et al.* 2017).

A contaminação por pesticidas não se resume apenas a águas e a solos contaminados devido à pulverização, pois o ser humano se intoxica ao realizar a pulverização quando não está devidamente protegido. A ingestão de alimentos contaminada por resíduos de pesticidas também provoca a contaminação, a qual pode ser comprovada pela presença de pesticidas em amostras de sangue, urina e, até mesmo, no leite materno (GALLI, *et al.* 2006).

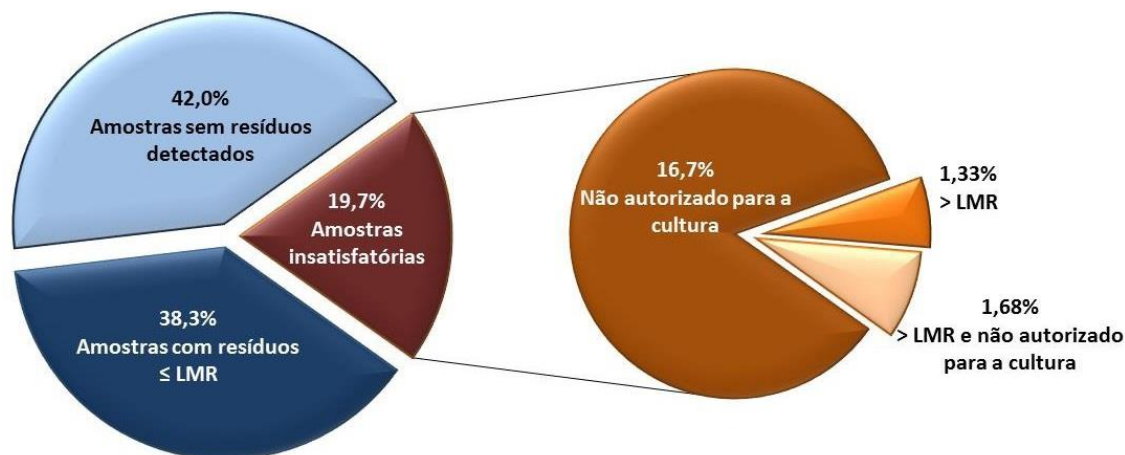
De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 2014 os dez princípios ativos mais utilizados no país foram os herbicidas glifosato, 2,4-D e atrazina, os inseticidas acefato, clorpirifós, metomil e imidacloprido, e os fungicidas mancozebe, carbendazim e tiofanato-metílico (também precursor de carbendazim). O consumo total destes compostos no Brasil neste mesmo ano chegou a 326.039 mil toneladas, destacando o país no ranking mundial. Devido à sua importância, há um número expressivo de normas legais brasileiras tanto em relação à toxicidade quanto à escala de uso, eliminação de resíduos e embalagem, controle, inspeção e monitoramento. O referencial mais importante é a Lei nº 7802/89, que rege o processo de registro de um produto agrotóxico, regulamentada pelo Decreto nº 4074/02 (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2018).

O uso desses produtos se tornou essencial para o cultivo em grande escalanecessário para atender a demanda do mercado de alimentos. O problema para o consumidor é o mau uso dos pesticidas, como em dosagens incorretas, ou seja, acima do Limites Máximos de Resíduos (LMR), determinados pela ANVISA, ou o uso em plantações e fase de cultivo não indicados para o produto, pois assim tanto os alimentos quanto o meio ambiente podem receber níveis de resíduos muito acima daqueles permitidos por lei (COSTA *et al.*, 2017).

A FIGURA 1 apresenta a distribuição dos resíduos de agrotóxicos encontrados nas 12.051 amostras de alimentos monitorados no período de 2013 a 2015 pelo Programa de

Análises de Resíduo em Alimentos (PARA), coordenado pela ANVISA, em conjunto com os órgãos estaduais e municipais de vigilância sanitária e laboratórios estaduais de saúde pública.

FIGURA 1 - Distribuição das amostras analisadas segundo a presença ou a ausência de resíduos de agrotóxicos e o tipo de irregularidade.



Fonte: (PARA, 2016).

Neste estudo, foram analisadas 12051 amostras de 25 alimentos de origem vegetal representativos da dieta da população brasileira: abacaxi, abobrinha, alface, arroz, banana, batata, beterraba, cebola, cenoura, couve, feijão, goiaba, laranja, maçã, mamão, mandioca (farinha), manga, milho (fubá), morango, pepino, pimentão, repolho, tomate, trigo (farinha) e uva. As amostras foram coletadas em estabelecimentos varejistas localizados nas capitais de todo território nacional. Foram pesquisados até 232 agrotóxicos diferentes nas amostras monitoradas. Dessas amostras, 9680 (80,3%) foram consideradas satisfatórias, sendo 5062 (42,0%) não apresentaram resíduos dentre os agrotóxicos pesquisados e 4618 (38,3%) apresentaram resíduos de agrotóxicos dentro do Limite Máximo de Resíduos (LMR) estabelecido pela ANVISA. Foram consideradas insatisfatórias 2371 amostras (19,7%), sendo que 362 destas amostras (3,00%) apresentaram concentração de resíduos acima do LMR e 2211 (18,3%) apresentaram resíduos de agrotóxicos não autorizados para a cultura.

Os métodos usados na determinação de resíduos de pesticidas em matrizes como água, solo, folha e fruto requerem, em geral, que se efetue previamente uma extração, e muitas vezes pré-concentração desses compostos. Os métodos clássicos de extrações com solventes, como a extração líquido-líquido (ELL) e a extração líquido-sólido (ELS) (KOVAI, PROSEN e ZUPANI-KRALJ, 2004) são mais comumente utilizados devido à facilidade de manuseio e simplicidade dos equipamentos. Porém, a ELL envolve o uso de grandes quantidades de solventes tóxicos e de alto custo, além de elevado tempo de análise, formação

de emulsões e falta de sensibilidade para analitos mais voláteis (SICÍLIA *et al.*, 1999; QUINA e HINZE, 1999; CARABIAS-MARTÍNEZ *et al.*, 2000). A extração em fase sólida (EFS), embora apresente algumas vantagens em relação à ELL, tem como desvantagens a saturação dos sítios adsorventes resultando na diminuição do fluxo de solvente pelo cartucho, falta de reprodutibilidade e, em muitos casos, a não reutilização dos cartuchos (MAHARA, BOROSSAY e TORKOS, 1998). Desta forma, o desenvolvimento de técnicas alternativas de extração de resíduos de diferentes pesticidas em águas e alimentos é de fundamental importância, pois estes são os principais caminhos de ingestão destes contaminantes pelo ser humano.

Muitos trabalhos sobre determinação eletroanalítica de pesticidas em alimentos, “*in natura*” ou industrializados tem sido publicados nos últimos anos, sendo que a maior parte correspondente à utilização de eletrodos modificados com enzimas (biossensores) e eletrodos de mercúrio (GALLI *et al.*, 2006). O uso do eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) tem sido usado com sucesso para substituir os eletrodos de mercúrio (SELVA & DA PAIXAO, 2016).

Na literatura, alguns trabalhos têm relatado o estudo de pesticidas por detecção eletroquímica (YANG *et al.*, 2015; DONG *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2020; CAIXETA-NETA *et al.*, 2020; GUO *et al.*, 2011; NOYROD *et al.*, 2014 e RAZZINO *et al.*, 2015), enquanto outros se concentraram em determinar a presença de CBZ usando diferentes técnicas de detecção (HALKO *et al.*, 2004; MORAL *et al.*, 2009 e DÍAZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2019). Entretanto, até onde foi possível verificar, não há relato na literatura sobre o uso de EPN com detecção eletroquímica de CBZ usando eletrodo de DDB em qualquer matriz. Além disso, estudos sistemáticos sobre a otimização desta técnica (EPN) em determinações eletroanalíticas têm sido ainda pouco explorados.

Assim, torna-se primordial o desenvolvimento de técnicas tanto de extração, quanto de detecção desses contaminantes em amostras reais. Nesse sentido, o uso da técnica de extração por ponto nuvem (EPN) como etapa de extração e/ou pré-concentração do analito que anteceda análises de compostos orgânicos específicos, tem se tornado foco de interesse de diversos ramos de pesquisa (ROCHA, 2013).

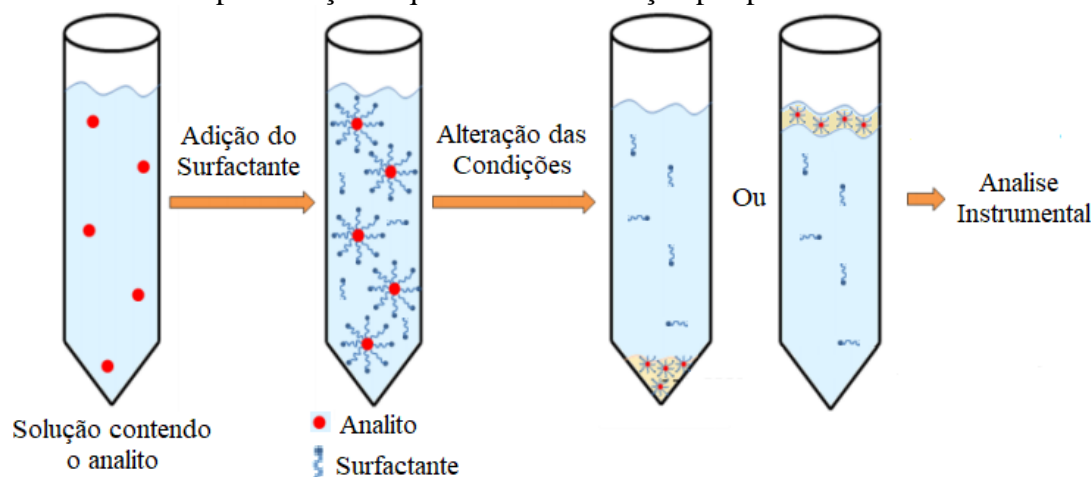
1.2 - EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM (EPN)

O método de EPN foi primeiramente adotado por WATANABE & TANAKA (1978) para a extração de íons metálicos e, desde então, tem sido extremamente investigado na pré-concentração e separação de íons metálicos, poluentes orgânicos, proteínas, hormônios

e vírus (BEZERRA & FERREIRA, 2006; GORTZI *et al.*, 2008; SILVA, 2008; WU *et al.*, 2008; WANG & DAI, 2010).

A EPN é uma técnica que se baseia no uso de surfactantes como solvente extrator onde uma solução aquosa de um surfactante torna-se turva pela adição de uma substância apropriada ou por alteração de algumas de suas propriedades, tais como temperatura, força iônica do meio ou pressão. A turbidez da solução ocorre porque o surfactante atinge o chamado ponto nuvem. Assim, a solução separa-se em duas fases isotrópicas distintas: uma rica em surfactante contendo o analito orgânico ou inorgânico desejado e de pequeno volume, e outra fase pobre em surfactante, de grande volume, e com a concentração do surfactante próxima a sua concentração micelar crítica (BEZERRA & FERREIRA, 2006). A fase rica em surfactante tanto pode estar na parte inferior, quanto na parte superior, dependendo da densidade do surfactante, como mostra a FIGURA 2.

FIGURA 2 - Representação esquemática da extração por ponto nuvem.



Fonte: (Adaptado de XIE *et al.*, 2010).

Essa técnica está de acordo com os princípios da "Química Verde", já que é considerada uma "técnica limpa", pois utiliza como meio extrator soluções diluídas de surfactantes, contribuindo para uma pequena geração de resíduos de laboratório, de baixa toxicidade, não-voláteis, e muito pouco inflamáveis. Assim é considerada uma técnica promissora, comparada com a Extração líquido-líquido convencional (ELL) ou Extração em fase sólida (SPE), que utilizam maiores volumes de solventes orgânicos (TOBISZEWSKI *et al.*, 2009).

A EPN possui a propriedade de "solubilizar" compostos orgânicos no núcleo micelar hidrofóbico. Portanto, é amplamente explorada para a extração/pré-concentração de compostos orgânicos oriundos de matrizes complexas, como amostras ambientais (solo,

sedimentos, lamas, carvão, e cinzas de madeira), fluidos biológicos (urina, sangue e etc) e organismos marinhos (CARABIAS-MARTÍNEZ *et al.*, 2000; XIE *et al.*, 2010), sendo amplamente difundida em várias áreas de concentração da ciência, como por exemplo, indústria alimentícia e farmacêutica, química aplicada, química ambiental, biologia, medicina, entre outras (BEZZERRA *et al.*, 2005; LOPES, 2011; GORTZI *et al.*, 2008; TAECHEGAN *et al.*, 2009; MUKHERJEE *et al.*, 2011). No entanto, seu uso para extração e pré-concentração de pesticidas em amostras reais de água, sucos industrializados, solo e frutas tem sido ainda pouco explorado (FARIA *et al.*, 2015; XIE *et al.*, 2010).

LIU *et al.* (2014) descreveram o processo de EPN e determinação por HPLC-UV para herbicidas da classe das triazinas em leite. O procedimento incluiu a aplicação de uma solução do surfactante não iônico Triton X-100 para determinação de quatro triazinas (atrazina, cianazina, simazina esimetrina). Para isso, volumes de 10 mL de leite foram misturados com o agente tensoativo, ácido acético glacial e sulfato de sódio anidro, e diluídos até 15 mL com água pura. A solução obtida foi centrifugada e, em seguida, o sobrenadante foi filtrado por meio de uma membrana de 0,45 μm e ajustado a pH 5 com NaOH. Uma alíquota de 9 mL de sobrenadante foi incubado a 60 °C durante 30 min para induzir a separação de fases. A fase rica em surfactante foi diluída para 2 mL com metanol, centrifugada novamente, filtrada por meio de uma membrana de 0,22 μm e então analisada por HPLC com um detector UV-Vis. As curvas analíticas das quatro triazinas mostraram-se lineares na faixa de 50-2000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os limites de detecção obtidos estiveram na faixa de 6,79-11,19 mg L^{-1} e as recuperações médias foram de 70,5-96,9%.

ZHANG *et al.* (2014) propuseram um método de extração por ponto nuvem com Triton X-114, para análise de seis pesticidas organofosforados em amostras de maçã e pera. Neste procedimento de EPN, os efeitos do volume de surfactante, massa de cloreto de sódio, temperatura de equilíbrio, tempo de equilíbrio e pH do procedimento de extração foram investigados. Sob condições ideais, foi obtido limite de detecção de 0,44-5,20 $\mu\text{g/kg}$.

SANTALAD *et al.* (2009) desenvolveram um método de EPN, com o surfactante não iônico Triton X-114, para a extração e pré-concentração de inseticida carbamatos em amostras de frutas. Neste trabalho foi feita uma extração prévia com solvente orgânico. As condições ótimas encontradas foram de concentrações de Triton X-114 e NaCl a 1,5% (m/v) e 7,0% (m/v), respectivamente e 20 min para a separação das fases a 45 °C. A fase rica em surfactante foi analisada por HPLC-UV (270 nm) de fase reversa, fase móvel contendo metanol e ácido acético 0,1% (v/v). Sob essas condições, seis carbamatos usados

como inseticidas foram separados com sucesso em 27 min. Os limites de detecção nas amostras de frutos estudadas foram na faixa de 0,1-1,0 mg kg⁻¹. Nenhum inseticida carbamato foi detectado nas amostras investigadas. A recuperação das amostras foi entre 80,0 e 107% e o método CPE foi considerado ser uma metodologia promissora para a pré-concentração de analitos, com um fator de pré-concentração de 14.

HALKO *et al.* (2004) empregaram os surfactantes Genapol X-080 e POLE na extração de fungicidas do grupo dos benzimidazois e seus resíduos (benomil, carbendazim, tiabendazol e fuberidazol) em amostras de água. Os extratos foram analisados por cromatografia líquida com detecção por fluorescência. A eficiência de recuperação dos fungicidas pelo método de EPN foi comparável à extração em fase sólida (EFS) com recuperações na faixa de 68-98%. O fator de pré-concentração (F_C) obtido com o método proposto foi igual a 10, com limite de detecção de 6 µg L⁻¹ para o carbendazim, empregando o surfactante POLE em concentração de 4% (m/v).

A EPN pode também ser associada a outros processos incluindo micro-ondas, ultrassom e agitação para a determinação eficaz de compostos orgânicos (YAO & YANG, 2008; XIE *et al.*, 2010). Um problema inerente em EPN é a elevada viscosidade da fase rica em surfactante. Assim, em algumas aplicações, um volume relativamente pequeno de um solvente apropriado, como água, metanol, etanol, acetonitrila ou uma solução aquosa de outro surfactante, deve ser adicionado no sentido de suprimir o problema de viscosidade (XIE *et al.*, 2010).

1.2.1 - SURFACTANTES

Os surfactantes (ou tensoativos) são substâncias orgânicas anfipáticas que apresentam uma longa cadeia hidrofóbica e um pequeno grupo carregado ou polar hidrofílico.

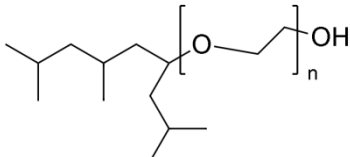
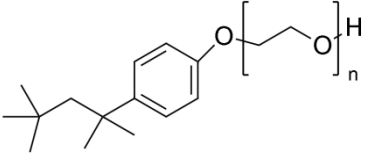
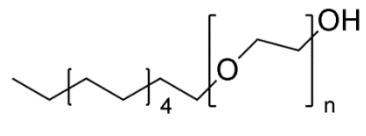
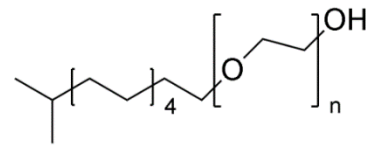
A classificação dos surfactantes está baseada na natureza da região hidrofílica, podendo pertencer a uma das seguintes categorias: não iônicos, não apresentam cargas; catiônicos, apresentam cargas positivas; aniônicos, apresentam cargas negativas e zwitteriônicos ou anfóteros, possuem uma porção catiônica e outra aniônica, e por isso suas moléculas são eletricamente neutras (BEZERRA *et al.*, 2005).

Nos surfactantes derivados de alcoóis secundários de alquilpolioxietileno, a parte hidrofóbica é formada por grupos alquila e a parte hidrofílica por cadeias de moléculas de oxietileno (EO) (WANG & DAI, 2010), o que lhes caracterizam como surfactantes não iônicos. A TABELA 1 mostra o balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) e a correspondente

temperatura de ponto nuvem (TPN) bem como o número de unidades de EO (WANG & DAI, 2010).

A combinação de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos em uma única molécula confere aos surfactantes propriedades únicas de dissolução em água e outros solventes. Os grupos anfifílicos fornecem agregados tridimensionais, principalmente micelas aquosas/reversas ou vesículas, acima de uma concentração de agregação crítica e, em seguida, essas estruturas se auto-organizam em agregados maiores que se separam do volume da solução coloidal como uma nova fase líquida, por meio de um fenômeno conhecido como coacervação (BALLESTEROS-GÓMEZ *et al.*, 2010).

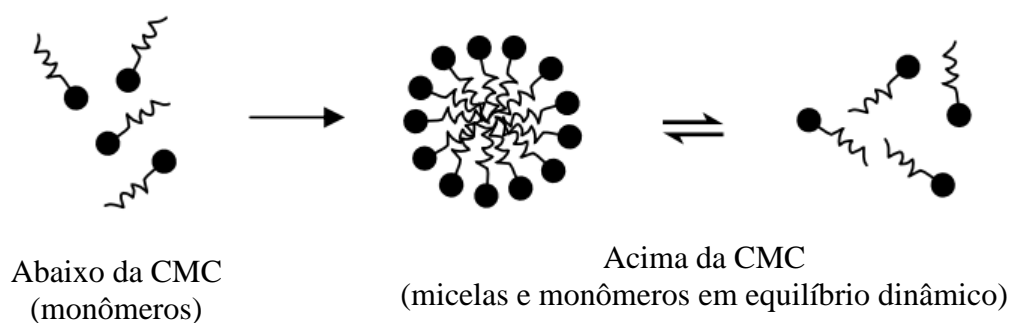
TABELA 1 - Parâmetros dos surfactantes não iônicos utilizados em EPN. Adaptado pelo autor (WANG & DAI, 2010).

Surfactante	Estrutura química	Média de unidades de EO	HLB	TPN (°C)	CMC (mM)
Tergitol TMN-6		6	13,1	36	0,16
Triton X-114 (OPEO 7.5)		7,5	12,3	25	0,2
Brij 30 L4		4	9,7	25	0,023
Genapol X-080		8	13	74	0,066

As micelas são estruturas supramoleculares de dimensões coloidais, formadas a partir de moléculas de surfactantes que se agregam espontaneamente em solução aquosa

quando estas atingem uma faixa específica de concentração denominada concentração micelar crítica (CMC). Abaixo da CMC, o surfactante está predominantemente na forma de monômeros não associados. Porém, quando a CMC é ultrapassada, o processo de formação de agregados micelares é favorecido, dentro de uma dinâmica de equilíbrio com seus próprios monômeros, indicando que as micelas não são estruturas estáticas (ROCHA, 2013). A FIGURA 3 mostra uma representação da formação de um agregado micelar.

FIGURA 3 - Representação esquemática da formação de um agregado micelar.



Fonte: Adaptado de BEZZERRA *et al.*, 2005).

Sob o ponto vista analítico, uma das propriedades mais importantes dessas estruturas organizadas é a sua capacidade de solubilizar analitos com diferentes características e naturezas. Tais solutos podem interagir eletrostaticamente, hidrofobicamente ou pela combinação desses dois efeitos. Dessa forma, a estrutura do surfactante está diretamente envolvida nesse processo (FARIA *et al.*, 2015).

Um dos principais parâmetros a serem considerados no processo de EPN é a temperatura do ponto nuvem, uma vez que é nesta temperatura que a turbidez da solução pode ser observada. A temperatura de ponto nuvem de soluções micelares pode ser alterada pela adição de sais, alcoóis, outros surfactantes de caráter iônico bem como pela adição de algumas substâncias orgânicas ou inorgânicas que provoquem o aumento (efeito “*salting-in*”) ou a diminuição (efeito “*salting-out*”) da solubilidade da fase micelar em água (COSTA, 2013). Por exemplo, os sais caotrópicos, como os de ânions SCN^- , Γ^- e Br^- , levam ao efeito “*salting-in*”, ou seja, aumentam as temperaturas de ponto nuvem. Por outro lado, a adição de eletrólitos de caráter cosmotrópico, como os ânions F^- , Cl^- , SO_4^{2-} e CO_3^{2-} , promovem a redução de ligações de hidrogênio envolvendo a rede de moléculas da água, com conseqüente hidratação dos grupos oxietileno. Como resultado, a temperatura de ponto nuvem dos surfactantes é diminuída em função da redução da solubilidade dos monômeros do surfactante. (COSTA, 2013; ROCHA, 2013).

Além da temperatura, a concentração do surfactante também exerce um papel importante no processo de separação de fases. Há uma estreita faixa de concentração do surfactante em que a separação das fases ocorre com maior facilidade, e na qual a eficiência de extração e, conseqüentemente, o sinal analítico deve ser máximo. Acima dessa faixa, o sinal analítico é prejudicado devido ao aumento do volume final da fase micelar, o que afeta o fator de pré-concentração (F_C) resultando, portanto, em efeitos de diluição. Por outro lado, se a concentração de surfactante for menor do que a mínima recomendada na faixa, a precisão e reprodutibilidade das medidas podem ser afetadas devido ao volume da fase resultante rica em surfactante não ser suficiente para serem obtidas medidas reprodutíveis da extração e separação (PALEOLOGOS *et al.*, 2005).

1.2.2- FATOR DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO (F_C)

O fator de pré-concentração (ou fator de enriquecimento) é o parâmetro analisado para verificar a eficiência da extração e da pré-concentração. Quanto maior o seu valor, melhor a eficiência. O F_C é definido como sendo a razão entre o volume da solução usado e o volume da fase rica em surfactante (coacervato). Calculado dessa forma, admite-se uma transferência total do analito para a fase micelar (ESCALEIRA, 2005). A forma mais correta para determinar o F_C é construindo duas curvas analíticas: uma com procedimento de extração e a outra sem o procedimento de extração. O F_C (Equação 1) é determinado pela razão entre os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas com (a_1) e sem (a_2) o procedimento de extração (ESCALEIRA, 2005; COSTA, 2013).

$$F_C = a_1/a_2 \quad \text{(Equação 1)}$$

1.3- MORANGO

O morango é um pseudo-fruto, originário do receptáculo floral que se torna carnoso e suculento, além de rico em vitamina C. Os frutos verdadeiros são pequenos aquênios, frequentemente denominados "sementes". Os morangos são consumidos in natura ou aproveitados para fabricação de iogurtes, sucos, geléias, bolos, etc.

Segundo o Centro de Frutas, ligado ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), o morangueiro tem sido uma das culturas com maior utilização de pesticidas na agricultura nacional, em consequência de práticas agrícolas incorretas e também de sua elevada susceptibilidade a pragas e doenças. Dentre os defensivos agrícolas cadastrados para morangueiro destacam-se: (a) inseticidas: abamectin, carbaryl, dimethoate, fenprothrin, malathion, mevinphos, naled e dichlorvos; (b) fungicidas: benomyl, captan, dodine, enxofre, fluazinam, folpet, hidróxido de cobre, iprodione, mancozeb + tiofanato-metílico (que se

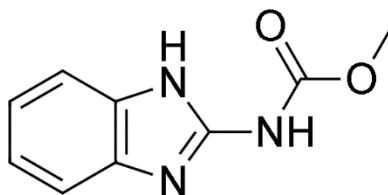
converte em carbendazim), oxicloreto de cobre, oxicloreto de cobre + mancozeb, procimidone, thiram e tiofanato-metílico; (c) acaricidas: cyhexatin, enxofre, fenopatrina, naled e propargite. Outros produtos cadastrados incluem o metaldeído (iscas moluscicidas para controle de lesmas), brometo de metila e dazomet (desinfestação de canteiros ou de substratos).

De acordo com o Relatório do Programa de Análises de Resíduo em Alimentos (PARA), coordenado pela ANVISA, no período de 2013 a 2015, foram analisadas 157 amostras de morango. Destas, 43 foram consideradas satisfatórias, sendo que duas amostras não apresentaram resíduos dos agrotóxicos pesquisados e 41 apresentaram resíduos em concentrações iguais ou inferiores ao limite máximo de resíduos (LMR). No total, foram detectados 48 agrotóxicos diferentes dentre os 165 pesquisados. O carbendazim (92 amostras), a azoxistrobina (78 amostras) e o difenoconazol (60 amostras) foram os que apresentaram maior número de detecções nas amostras analisadas. Dessa forma, fica evidente a necessidade de pesquisas relacionadas à detecção de pesticidas em morangos.

1.4- CARBENDAZIM

O carbendazim (CBZ) está entre os dez pesticidas mais utilizados no Brasil, sendo que no ano de 2014 foram comercializadas 5141,10 mil toneladas desse composto (IBGE, 2016). O CBZ (Metil 2-benzimidazolcarbamato) possui fórmula molecular $C_9H_9N_3O_2$, solubilidade em água de 8 mg L^{-1} em pH 7 e 29 mg L^{-1} em pH 4 e pKa de 4,53 (MELGAR, 2009). Trata-se de um fungicida sistêmico, pertencente ao grupo dos benzimidazóis e a classe toxicológica III (moderadamente tóxico), sendo seu uso permitido nas culturas de feijão, arroz, trigo, soja, citros, e como preservante de madeira, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Além disso, o CBZ (FIGURA 4) é utilizado principalmente no combate de pragas, como a *Guignardiacitricarpa* (pinta preta) e *Colletotrichumacutatum* (estrelinha), que são fungos comuns em lavouras de laranjas.

FIGURA 4 - Estrutura química do Carbendazim



Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar de ser classificado como moderadamente tóxico pela ANVISA, a *Food and Drug Administration* (FDA), agência norte-americana responsável pela fiscalização de alimentos e medicamentos, proíbe o uso do fungicida CBZ. Segundo a tabela toxicológica da U.S. Environmental Protection Agency (EPA), o CBZ é considerado do grupo C, classificado como carcinogênico em humanos (FRANÇA *et al.*, 2012; SILVA, 2014). Pesquisas experimentais relatam a formação de neoplasias hepatocelulares em fêmeas de camundongos e a indução da atividade tumoral em células do ovário humano (SILVA, 2014; MORINAGA, 2004).

Como medida de precaução, a FDA está realizando seus próprios testes de identificação de CBZ no suco de laranja importado do Brasil, não permitindo carregamentos de sucos com mais de 10 ppb (partes por bilhão) de CBZ em suas análises. Vale ressaltar que o valor de ingestão diária aceitável (IDA) regulamentado no Brasil é de 0,02 mg/kg de peso corporal (p.c.), ou seja 0,02 ppm (SILVA, 2014).

De acordo com o Relatório de Atividades de 2013 a 2015, do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA, o CBZ foi detectado em 2.553 mil amostras, correspondendo a 21% das amostras analisadas nesse período, sendo que 327 amostras foram consideradas insatisfatórias, ou seja, acima do LMR de 0,05 a 5,0 mg/kg (ANVISA, 2016). Na avaliação dos resultados, foram considerados os LMR estabelecidos nas monografias do CBZ e do tiofanato-metílico (ANVISA, 2018) cujos resíduos são expressos como CBZ, já que produtos à base de tiofanato-metílico se convertem em CBZ (MELGAR, 2009).

1.4.1 - DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DO CBZ

Nos últimos anos, técnicas eletroquímicas vêm se mostrando muito eficientes para a determinação de uma extensa classe de compostos orgânicos, uma vez que o avanço nas áreas de Eletroquímica e Química de Materiais contribui para o desenvolvimento de novos sensores eletroquímicos que permitem a determinação de concentrações cada vez menores, além de proporcionar valores elevados de frequência analítica, dado a rapidez com que medidas eletroquímicas podem ser realizadas (GALLI *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2009; PIWOWARSKA *et al.*, 2010).

No trabalho de NOYROD *et al.* (2014) foi descrito um método para a determinação simultânea de dois pesticidas, isoproturona e carbendazim, por meio de um sensor eletroquímico (*screen-printed*) à base de grafeno por voltametria de onda quadrada. Uma alíquota de 60 μ L da amostra de teste (eletrólito fortificado) foi analisada e picos

referentes a oxidação da isoproturona e CBZ foram detectados. As correntes de pico de oxidação variaram linearmente para concentrações de 0,02-10,0 mg L⁻¹ ($R^2 = 0,9991$) para isoproturona e 0,50-10,0 mg L⁻¹ para CBZ ($R^2 = 0,9990$). Os LD (3S_b/S) foram de 0,02 mg L⁻¹ e 0,11 mg L⁻¹ para isoproturona e CBZ, respectivamente. O método proposto foi aplicado para determinar as concentrações de isoproturona e CBZ em amostras de água, solo e vegetais. As taxas de recuperação das amostras contaminadas variaram entre 81,4% e 107% e os resultados foram estatisticamente semelhantes aos obtidos a partir do método padrão por HPLC-UV.

GUO *et al.* (2011) usaram nanofolhas híbridas de ciclodextrina-grafeno (CD-GNs) como material de eletrodo para a detecção eletroquímica de CBZ em água. As correntes de pico de CBZ no eletrodo de carbono vítreo modificado (GNs/GCE) e nas CD-GNs/GCE foram aumentadas em 11,7 e 82,0 vezes, respectivamente, em comparação com a GCE sem modificação. Nas CD-GNs/GCE, as correntes de pico aumentaram linearmente com a concentração de CBZ na faixa de 5 nmol L⁻¹ a 450 nmol L⁻¹. O LD de CBZ alcançou 2 nmol L⁻¹ com base nas características de sinal-ruído (S/N = 3) e as recuperações em amostras de água situaram-se entre 98,9% e 104,5%.

No trabalho de RAZZINO *et al.* (2015) foi descrito o uso do eletrodo de carbono vítreo modificado com um filme fino de sílica mesoporosa/parede múltipla de nanotubos de carbono, para determinação voltamétrica do fungicida CBZ. O material híbrido (SiO₂/MWCNT) foi obtido por um processo sol-gel usando HF como catalisador. A resposta amperométrica à CBZ foi medida em +0,73 V vs. Ag/AgCl por voltametria de onda quadrada a pH 8,0. O eletrodo modificado (SiO₂/MWCNT/ GCE) respondeu ao CBZ na faixa linear de 0,2 μmol L⁻¹ a 4,0 μmol L⁻¹ e o LD calculado por meio de métodos estatísticos foi de 0,056 μmol L⁻¹. O sensor permitiu a determinação do CBZ em amostras reais não tratadas de suco de laranja, mesmo na presença de possíveis interferentes como o ácido ascórbico e ácido cítrico, que são os principais compostos do suco de laranja.

1.5- ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO (DDB)

Devido às suas propriedades únicas, o diamante é um excelente candidato a material de eletrodo quando dopado apropriadamente para adquirir uma adequada condutividade, como é o caso dos filmes finos de DDB (HUPERT *et al.*, 2003; PLESKOV, 2000; SUFFREDINI *et al.*, 2004; ALFARO *et al.*, 2006). Para se obter condutividade elétrica suficiente para medidas eletroquímicas, filmes de diamante devem ser dopados com uma concentração mínima de átomos de dopante de $1,0 \times 10^{19} \text{ cm}^{-3}$, sendo que o boro atualmente é o dopante mais utilizado. A resistividade do diamante depende da concentração de boro no

filme, sendo que suas propriedades variam sucessivamente, à medida que essa concentração aumenta, de material dielétrico a semicondutor, a semicondutor degenerado e finalmente, a semi-metal (PLESKOV, 2000).

Filmes finos de DDB possuem um importante número de propriedades eletroquímicas distinguíveis das de outras formas de carbono ligado por sp^2 comumente usadas como eletrodos, tais como carbono vítreo, grafite pirolítico e pasta de carbono. Entre essas propriedades destacam-se: (i) baixa e estável corrente de fundo; (ii) ampla janela de potencial em meios aquosos e não-aquosos; (iii) extraordinária estabilidade morfológica e microestrutural a altas densidades de corrente (por exemplo, 0,1-10 Acm^{-2} , em H_3PO_4 85%); (iv) boa resposta a alguns analitos aquosos e não-aquosos, após pré-tratamento convencional, e (v) estabilidade na resposta a longo prazo como por exemplo, após exposição ao ar durante meses (FUJISHIMA, 1999; ANDRADE, *et al.*, 2009 e PEREIRA, *et al.*, 2012).

As superfícies dos eletrodos de DDB recém-preparados são hidrofóbicas, muitas vezes sua superfície precisa ser modificada no sentido de permitir que medidas eletroquímicas sejam realizadas, ou seja, torná-los menos hidrofóbicos ou, até mesmo, hidrofílicos. Tais modificações podem ser feitas eletroquimicamente, tanto anodicamente, com terminações com oxigênio, como catodicamente, com terminações em hidrogênio (PLESKOV, 2002; HUPERT *et al.*, 2003; SALAZAR-BANDA *et al.*, 2006).

Pouquíssimos trabalhos têm sido encontrados na literatura relacionados à detecção de fungicidas utilizando eletrodo de DDB seja por quaisquer técnicas e/ou matrizes. As pesquisas estão voltadas principalmente para a classe dos organoclorados e orgnofosforados (PACHECO *et al.*, 2010).

No trabalho desenvolvido por DORNELLAS *et al.* (2014), o fungicida piraclostrobina foi extraído de amostras de água e suco de uva por meio de SPE, previamente diluídos com água pela metade e posteriormente enriquecidos com adição de padrão. A determinação eletroquímica foi realizada por meio de voltametria de onda quadrada, com eletrodo de trabalho de DDB, utilizando tampão acetato ($0,050 \text{ mol L}^{-1}$; pH 4,0). A resposta linear ($R^2 > 0,99$) foi de até $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($7,8 \text{ mg L}^{-1}$) com um LQ de $8,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,32 \text{ mg L}^{-1}$). Os valores de recuperação obtidos usando amostras de água fortificada com analito estavam entre 94 e 102%.

POP *et al.* (2017) usaram as técnicas de voltametria de pulso diferencial e voltamétrica cíclica para detectar individualmente e simultaneamente dois agrotóxicos, o carbaril, inseticida (CR) e paraquat, herbicida (PQ), em amostras de suco natural de maçã. Um eletrodo de DDB modificado com grafeno, denominado pelos autores de BDDGR, foi

obtido e aplicado com sucesso na detecção simultânea dos pesticidas CR e PQ, usando a técnica de voltametria de pulso diferencial em amostras de suco natural de maçã, com LQ de $0,59 \mu\text{mol L}^{-1}$ para CR e $0,14 \mu\text{mol L}^{-1}$ para PQ.

SVORC *et al.* (2013) desenvolveram um novo método eletroquímico simples e sensível para a determinação de atrazina em amostras de água de rio com recuperação satisfatória (92% a 100%) e boa concordância com resultados obtidos por HPLC, no intervalo de confiança para 95%. Os autores usaram a técnica de voltametria de onda quadrada, eletrodo de trabalho de DDB, em solução tampão Britton-Robinson, pH 3. A faixa de concentração linear obtida foi de $0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,999$, $n = 6$) com boa repetibilidade (desvio padrão relativo de 2,9% a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ para $n = 6$) e o LD foi de 10nmol L^{-1} . O método proposto foi aplicado com sucesso para determinação de atrazina.

Em trabalho publicado em nosso grupo de pesquisa, CAIXETA-NETA *et al.* (2020), foi desenvolvido um procedimento para determinação eletroanalítica do fungicida TBZ extraído e pré-concentrado pela técnica de EPN, em amostras de tomate. A técnica analítica utilizada para esta determinação foi a HPLC acoplado a um detector eletroquímico (HPLC-EC), com um eletrodo DDB. A condição ótima de EPN foi alcançada usando Tergitol (19% v / v), NaCl (0,83 g), tempo de agitação ultrassônica de 15 min e temperatura de 36°C . Nessas condições, o fator de pré-concentração obtido foi de 5,7. Os LD e LQ foram $2,7 \times 10^{-8} \text{mol L}^{-1}$ (ou $5,4 \mu\text{g L}^{-1}$) e $5,5 \times 10^{-8} \text{mol L}^{-1}$ (ou $11 \mu\text{g L}^{-1}$), respectivamente. Os valores médios de recuperação variaram de 80,7% a 115,1% e a precisão (média de 3 dias) foi inferior a 15%. Ao aplicar o método para examinar tomates comerciais, o TBZ foi detectado em uma das três amostras analisadas.

1.6 - HPLC-EC

HPLC é uma técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, a fase móvel, líquida, e a estacionária, contida em uma coluna por afinidade química, o que lhes confere seletividade (ANDRADE *et al.*, 2009; YAMADA *et al.*, 2002; PIWOWARSKA *et al.*, 2010). Essa técnica é compatível com diferentes tipos de detectores tais como o eletroquímico (EC) (YAMADA *et al.*, 2002; ANDRADE *et al.*, 2009), por arranjo de díodo (DAD) (ALMEIDA & NOGUEIRA, 2006), ultravioleta (UV) (INGRAND *et al.*, 2003) ou espectrometria de massa (MS) (SHIMADA *et al.*, 2001).

As técnicas eletroquímicas vêm se mostrando bastantes promissoras para a determinação de uma extensa classe de compostos orgânicos, uma vez que o avanço

tecnológico contribui para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos que permitem a determinação de concentrações cada vez menores, além de apresentar baixo custo e permitir rapidez nas medidas (ANDRADE *et al.*, 2009; DORNELLAS *et al.*, 2014; POP *et al.* 2017; FREITAS *et al.*, 2018). A detecção eletroquímica, por sua vez não é seletiva para compostos que possuem mesmos, ou valores próximos, de potenciais de oxidação e/ou redução.

A combinação de detecção eletroquímica com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-EC) torna a detecção eletroquímica ainda mais eficaz, pois além de sensível passa a ser seletiva, permitindo assim a análise simultânea de vários compostos (ANDRADE *et al.*, 2009; PIWOWARSKA *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2010; BROSCENCHI *et al.*, 2014; DE AMORIM & ANDRADE, 2016, CAIXETA-NETA *et al.*, 2020).

1.7 - BIA

A Análise por injeção em batelada (BIA), do inglês *Batch Injection Analysis*, é uma técnica analítica, proposta por Wang e Taha (1991). Neste sistema, pequenas alíquotas de uma amostra ou padrão são injetadas diretamente na superfície do eletrodo de trabalho, posicionamento *wall-jet*, imerso em um grande volume de eletrólito suporte e inerte, com o auxílio de uma micropipeta. Esse volume de eletrólito suporte é suficiente para proporcionar a diluição do analito ou padrão, após obtido o sinal analítico, mantendo as mesmas características das células de grandes volumes, tais como precisão, simplicidade e alta frequência de análise. Além disso, o método proporciona o desenvolvimento de sistemas portáteis miniaturizados e evitam o desperdício de reagentes (WANG; CHEN, 1994; QUINTINO, 2003).

A associação desse sistema à detecção amperométrica e amperométrica de múltiplos pulsos (MPA) é uma ferramenta poderosa para a análise de alimentos, amostras ambientais e farmacêuticas (QUINTINO, 2003; PEREIRA, 2015; ALENCAR, 2018; OLIVEIRA, 2020; DE LIMA, 2018; BACKES, 2017; OLIVEIRA, 2016). O sistema BIA com detecção por voltametria de onda quadrada (BIA-SWV) foi usado por OLIVEIRA, (2015) para a determinação simultânea de zinco e nafazolina (NAF) em amostras farmacêuticas. Para isso usaram tampão acetato 0,05 mol L⁻¹, pH 4,7, volume de injeção de 100 µL, tempo de deposição (Zn) 5 s, potencial de deposição (Zn) -1,5 V, *f*: 100 s⁻¹, *a*: 60 mV, ΔE_s: 6 mV. Nessas condições, o método apresentou faixa linear de resposta entre 10 a 60 µmol L⁻¹ para Zn (*r* = 0,992) e entre 3,0 e 21 µmol L⁻¹ para NAF (*r* = 0,999), frequência

analítica de 70 análises por hora e LD de $0,126 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,04 \mu\text{mol L}^{-1}$ para Zn e NAF, respectivamente.

SILVA *et al.* (2017) mostraram a possibilidade de determinação simultânea de propifenazona, paracetamol e cafeína em amostras farmacêuticas usando BIA-SWV. Neste trabalho, o desempenho de um sistema BIA-SWV foi comparado com um sistema SWV convencional (em batelada). Segundo os autores, a troca e manipulação das amostras são mais simples e rápidas com o sistema BIA-SWV (80 análises por hora) em comparação com o sistema SWV convencional (20 análises por hora).

O sistema BIA-SWV foi usado por FREITAS *et al.* (2018) visando à rápida triagem e quantificação da sibutramina em formulações de ervas e amostras de suplementos dietéticos. A determinação seletiva de sibutramina foi possível usando solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito de suporte e DDB como eletrodo de trabalho. A triagem das amostras foi possível após um procedimento simples de preparação da amostra, a dissolução no eletrólito de suporte, com indicação confiável da presença ou ausência de sibutramina. Em condições otimizadas, a determinação de sibutramina foi possível com uma faixa linear de trabalho de 5 mg L^{-1} a 50 mg L^{-1} ($r > 0,99$) e LD variando de $0,08 \text{ mg L}^{-1}$ a $1,94 \text{ mg L}^{-1}$ (dependendo do tipo de amostra). Além disso, foi demonstrado que o método desenvolvido para SWV pode ser facilmente adaptado a um sistema portátil de análise por injeção em batelada (BIA), visando procedimentos de triagem rápidos e *in loco*.

O número de trabalhos publicados na literatura referente ao uso do sistema BIA e empregado na detecção e quantificação de pesticidas tem se mostrado pequeno. Por exemplo, o uso do sistema BIA-SWV foi aplicado para a detecção do herbicida paraquat por SIMÕES *et al.* (2007). Neste trabalho, o eletrodo de carbono vítreo foi usado como eletrodo de trabalho (diâmetro de 0,5 cm), contra eletrodo de platina, eletrodo de referência de calomelano saturado e tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,9 como eletrólito de suporte. Os resultados obtidos mostraram que o herbicida pode ser detectado em níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$ com pequenos volumes de injeção ($100 \mu\text{L}$). O tempo de cada medição foi inferior a dois segundos. O método apresentou vantagens tais como rapidez, alta reprodutibilidade boa sensibilidade, sem pré-adição ou troca do eletrólito de suporte.

DORNELAS *et al.*, (2015) comparou o desempenho de dois métodos eletroquímicos para a determinação de picoxistrobina (um fungicida da classe da estrobilurina). Os métodos foram voltametria de onda quadrada (SWV) e análise de injeção em batelada com detecção amperométrica de múltiplo pulso (BIA-MPA), ambos empregando

eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente. O método SWV apresentou maior sensibilidade com LD de $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ (ou $0,07 \text{ mg L}^{-1}$) e LQ de $0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ (ou $0,25 \text{ mg L}^{-1}$). Em comparação com o método BIA-MPA, os valores obtidos de LD e LQ foram de $1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ (ou $0,6 \text{ mg L}^{-1}$) e $5,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ (ou $2,0 \text{ mg L}^{-1}$), respectivamente. O método BIA-MPA forneceu uma faixa linear mais ampla (de $5,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em comparação com o método SWV (de $0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e taxa de frequência analítica mais alta (108 medições por hora).

MONTES *et al.* (2016) investigaram a detecção do fipronil em eletrodos de carbono vítreo (GCE) modificados e não modificados por nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT). Para isso, usaram a análise de injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica. Um pico de oxidação foi observado em 1,5 V em uma solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ HClO_4 / acetona (50:50, V/V) em ambas as superfícies. Embora o GCE modificado por MWCNT fornecesse maior sensibilidade, ele demonstrou baixo valor de precisão. Um limite de detecção de $4,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ e faixa linear de $25\text{--}300 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram obtidos usando um GCE sem modificação. O método foi aplicado em formulações veterinárias com resultados concordantes com os obtidos por HPLC.

SILVA *et al.* (2017) descreveram a determinação de mancozeb em amostras de inseticidas usando o método BIA com detecção amperométrica pulsada (PAD) em eletrodos de DDB. Os parâmetros amperométricos do BIA foram avaliados e as melhores respostas foram obtidas em solução de fosfato em pH 9,0 utilizando potencial de detecção de 0,3 V, potencial de limpeza de 0,0 V, velocidade de injeção de $160 \mu\text{L s}^{-1}$ e volume de injeção de $100 \mu\text{L}$. A curva analítica apresentou linearidade na faixa de $40\text{--}650 \mu\text{mol L}^{-1}$, com um LD de $5,14 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Os autores compararam a técnica desenvolvida com a titulação iodométrica padrão (método CIPAC), em um nível de confiança de 95% e erro relativo menor que 2%. O método BIA-PAD apresentou resposta rápida, alta sensibilidade, boa repetibilidade e boa reprodutibilidade.

CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um procedimento eletroanalítico, alternativo aos usualmente utilizados, para detecção e determinação dos teores do fungicida carbendazim em amostras de morango comercial, usando eletrodo de DDB, a partir da extração e pré-concentração pelo uso da técnica de extração por ponto nuvem.

Os objetivos específicos compreenderam:

- Otimizar os parâmetros experimentais nas etapas de extração e pré-concentração em ponto nuvem.
- Avaliar o desempenho de eletrodo de diamante dopado com boro (DDB), quanto à sinal eletroquímico de carbendazim obtido em solução aquosa; em amostras de morango. Validar um método analítico para a determinação e quantificação eletroquímica do carbendazim extraído de morango (EPN), obtido sob as melhores condições eletroquímicas e de extração pelo uso do eletrodo de DDB;
- Avaliar o emprego da técnica BIA para a determinação e quantificação do carbendazim na matriz morango

CAPÍTULO 3 - PARTE EXPERIMENTAL

3.1-PRÉ-TRATAMENTO DO ELETRODO DE DDB

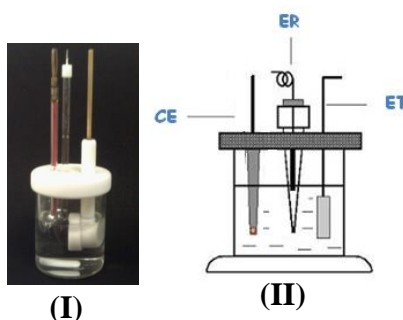
Antes de iniciar as medidas eletroquímicas utilizando o eletrodo de DDB, pré-tratamentos anódico e catódico sobre a superfície do eletrodo de DDB (área exposta de $0,32 \text{ cm}^2$) foram realizados, sendo o primeiro anódico com duração de 30 s e o segundo catódico com duração de 150 s, ambos utilizando uma densidade de corrente de $1,0 \text{ A cm}^{-2}$ em solução aquosa de H_2SO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$, Synth). Uma placa de Pt foi utilizada como contra-eletrodo e uma fonte de tensão/corrente (Instrutherm[®]) forneceu a corrente necessária para o pré-tratamento descrito.

Após o pré-tratamento do eletrodo de DDB, 60 varreduras por voltametria cíclica (CV) foram realizadas em solução contendo somente eletrólito suporte (KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 4,0) para estabilização da corrente capacitiva. Nessas medidas, o intervalo de potencial foi de 0 V a $1,4 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$) a uma velocidade de 250 mV s^{-1} . Esse procedimento foi realizado no início de cada dia de trabalho. Todas as medidas eletroquímicas realizadas neste trabalho (exceto as de pré-tratamento do eletrodo de DDB) foram feitas utilizando um Potenciostato/Galvanostato modelo PGSTAT 128N da AUTOLAB sendo as variáveis eletroquímicas controladas por meio do software GPES. As soluções aquosas foram todas preparadas usando água desionizada do tipo Mili-Q.

3.2 - VOLTAMETRIA CÍCLICA E VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL

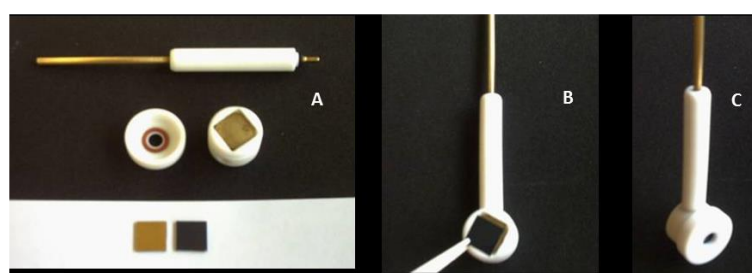
As medidas de voltametria cíclica (CV) e de pulso diferencial (SWV) foram feitas em modo batelada, utilizando célula eletroquímica do tipo convencional (3 eletrodos), tal como mostrado na FIGURA 5.

FIGURA 5 - Fotografia (I) e representação esquemática (II) da célula eletroquímica convencional de três eletrodos: eletrodo de referência (ER), contra-eletrodo (CE) e eletrodo de trabalho (ET).



O suporte para o eletrodo de trabalho utilizado, FIGURA 6, foi confeccionado em material de Teflon[®]. Uma placa de Pt foi utilizada como contra-eletródo e um eletrodo de Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹) foi utilizado como eletrodo de referência. O eletrodo de referência foi preparado a partir da eletrodeposição de AgCl sobre um fio de Ag utilizando solução saturada de KCl (3,0 mol L⁻¹) e aplicando-se uma corrente anódica de 0,11 A por 30 s.

FIGURA 6 - Suporte de teflon para o eletrodo de trabalho (DDB): (a) suporte aberto mostrando o compartimento onde o eletrodo de trabalho é colocado (b) eletrodo de trabalho sendo colocado no suporte e (c) suporte fechado pronto para ser usado nas análises eletroquímicas.



O eletrólito suporte utilizado nas medidas voltamétricas foi uma solução tampão de fosfato (KH₂PO₄-Synth) na concentração de 0,01 mol L⁻¹. Sempre que necessário, o pH do eletrólito suporte era ajustado com soluções de H₃PO₄ ou NaOH com auxílio de um pHmetro (GEAKA PG1800).

Os perfis voltamétricos (CV) do fungicida CBZ (Pestanal[®] Sigma-Aldrich 98.0%) foram obtidos no intervalo de potencial de 0,0 V a 1,4 V x Ag/AgCl (3 mol L⁻¹ KCl), a uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. Primeiramente, antes da obtenção do perfil voltamétrico do CBZ, fazia-se uma varredura do branco (40 mL do eletrólito suporte KH₂PO₄ 0,01 mol L⁻¹ em pH correspondente a medida), e posteriormente com auxílio de uma micropipeta, volumes de 400 μL da solução estoque de CBZ em metanol (1,0 mmol L⁻¹) eram adicionados aos 40 mL de eletrólito de suporte contidos na célula eletroquímica, resultando em uma solução de concentração analítica nominal de 10,0 μmol L⁻¹. A solução resultante era mantida sob agitação por 1 min para homogeneização. Após este procedimento, as varreduras eram efetuadas obtendo-se assim os perfis voltamétricos dos analitos na faixa de pH 2 ao 11.

Para a escolha do pH que proporcionasse o maior sinal analítico, foram realizadas medidas eletroquímicas de SWV (em solução aquosa de CBZ 5,0 μmol L⁻¹) com os seguintes valores fixos: amplitude 50 mV, Escada de potencial 5,0 mV, tempo de intervalo entre pulsos de 0,1 s. Posterior a escolha do pH mais adequado para as medidas, procedeu-se à

obtenção das melhores condições dos parâmetros de SWV (amplitude e escada de potencial) a serem utilizados. Para isso, a escada de potencial foi fixada em 5 mV, variou-se a amplitude no intervalo de 10 mV a 110 mV, encontrando-se, então, a melhor condição de amplitude com base na melhor sensibilidade (maior corrente de corrente de pico, I_p). Em seguida, fixou-se a amplitude na melhor condição encontrada na etapa anteriormente descrita e a escada de potencial foi variada entre 1 mV e 11 mV. Essas medidas foram realizadas no intervalo de 0,4 V a 0,9 V x Ag/AgCl (3 mol L⁻¹).

3.2.1-LIMITE DE DETECÇÃO

O limite de detecção obtido pela técnica de SWV para o CBZ foi determinado considerando-se o sinal da corrente de pico de oxidação como sendo, no mínimo, 3 vezes maior do que o sinal do ruído. Para isso, sucessivas injeções em quintuplicada foram feitas com diferentes concentrações do fungicida CBZ.

3.2.2-LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de quantificação obtido pela técnica de SWV do CBZ foi determinado considerando-se o menor sinal analítico que pode ser quantificado, com reprodutibilidade de pelo menos 75%, sem sofrer variação do E_p , em medidas realizadas em quintuplicada.

3.2.3-CURVA ANALÍTICA (SWV)

As SWV para a obtenção da curva analítica foram realizadas nas melhores condições encontradas para os parâmetros voltamétricos investigados, nas seguintes concentrações de CBZ: 1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 3,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 12,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 14,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 16,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 18,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Estas soluções foram obtidas com a adição de volumes de solução padrão de CBZ na concentração de 1,0 mmol L⁻¹. Todas as medidas foram realizadas em quintuplicata, e os valores de corrente atribuídos em cada ponto da curva foram obtidos pela média aritmética do sinal de corrente registrado de cada análise.

3.3-HPLC-EC

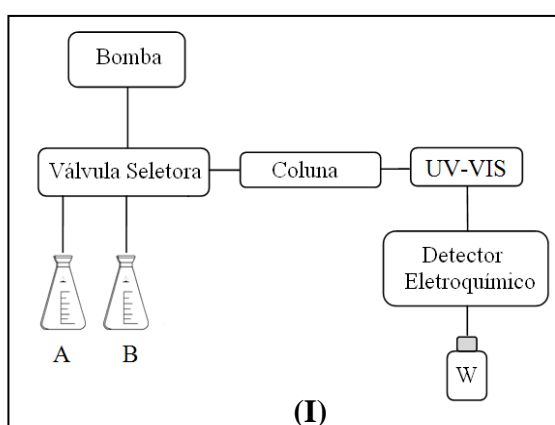
3.3.1-CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

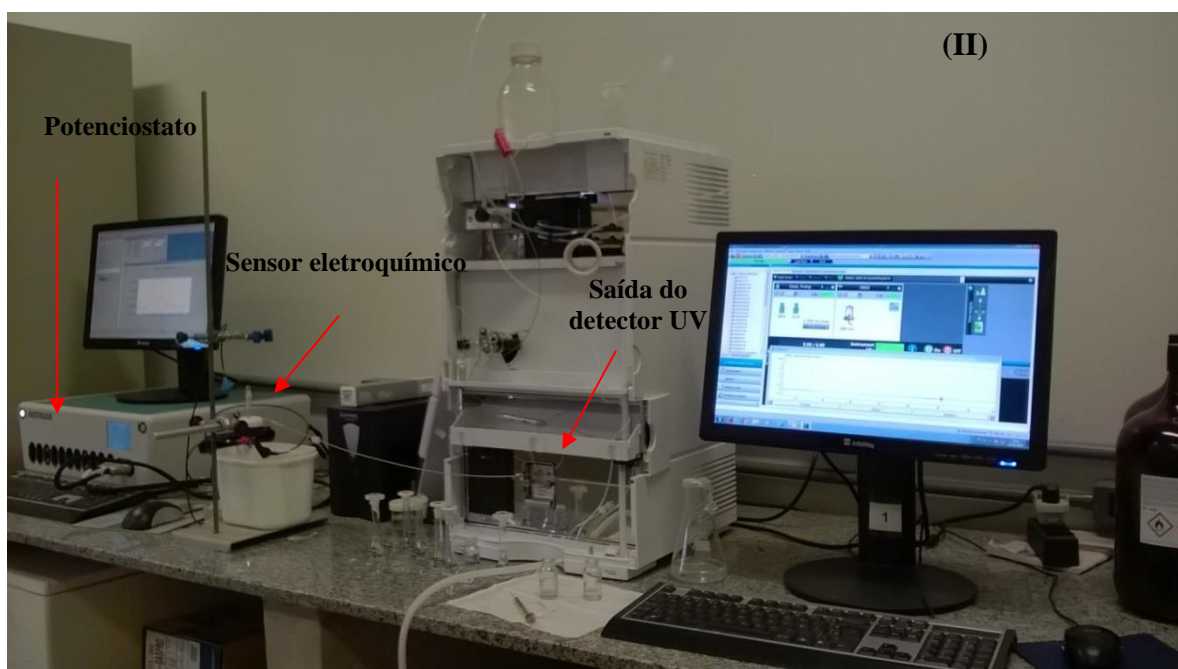
As análises por HPLC foram feitas em um cromatógrafo Agilent Technologies 12200 Infinity LC (modelo G4288B). A coluna cromatográfica utilizada foi uma coluna C8 (4.6 mm x 250 mm, ACE[®] 5 μm), com faixa de pH de trabalho compreendida entre 1,5–8,0. Alíquotas de 20 μL de CBZ foram injetadas na coluna a fim de obter condições que

resultassem em sinais de corrente de detecção do analito (cronoamperogramas) com picos bem definidos e separados. As alíquotas foram provenientes da extração em polpa de morango em pH natural (3,75), fortificadas com solução padrão de CBZ (procedimento descrito detalhadamente na seção 3.5), com o intuito de estabelecer uma condição cromatográfica com boa separação do analito CBZ frente aos interferentes da matriz. A obtenção das melhores condições cromatográficas foi realizada em diferentes vazões e composições de fase móvel contendo acetonitrila (ACN) e KH_2PO_4 (Synth) na concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 4. Para isso, o potencial aplicado foi fixado em $1,4 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Uma vez determinada as melhores condições cromatográficas (composição da fase móvel e vazão) procedeu-se à determinação da melhor condição de potencial a ser aplicado (voltamograma hidrodinâmico), variando-se os valores entre $1,10 \text{ V}$ e $1,45 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$).

Para a realização dessas análises por HPLC-EC, acoplou-se ao sistema cromatográfico (FIGURA 7) um sensor eletroquímico especialmente projetado e confeccionado para este fim (FIGURA 8). O sensor eletroquímico era controlado de forma paralela e independente por um potenciostato (PGSTAT 128N) e sua entrada era conectada diretamente à linha de saída do detector do cromatógrafo (UV-VIS). Dessa forma, os cromatogramas e os cronoamperogramas para o CBZ foram obtidos de forma individual e/ou simultânea.

FIGURA 7 - (I) Representação esquemática e (II) fotografia do sistema HPLC-EC usado para a detecção e quantificação do CBZ. W = Descarte; A e B = Frascos com fase móvel.

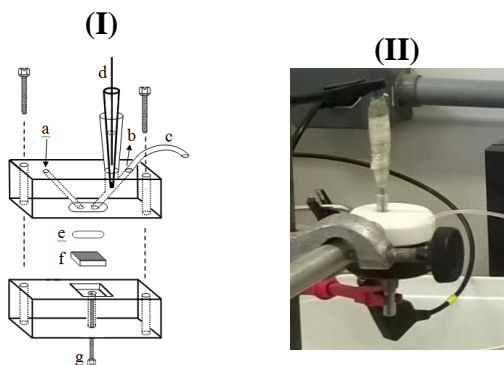




Fonte: Elaborada pela autora

O sensor eletroquímico (FIGURA 8) é constituído por dois blocos de Teflon[®], onde em um deles encontra-se o compartimento para o eletrodo de trabalho (f), de referência (d) e o contra-eletrodo (c). Na parte inferior do detector um parafuso fixado tem a função de fazer o contato elétrico com o eletrodo de trabalho (g). Um anel a base de silicone (e) é responsável pela vedação do sensor, impedindo que a solução (fase móvel) escape através da junção existente entre os dois blocos de Teflon[®]. Um canal de entrada (a) conduz a solução à superfície do eletrodo de trabalho e posteriormente a mesma passa por um canal de saída (c) (tubo de aço inoxidável) o qual também é utilizado como contra eletrodo.

FIGURA 8 - (I) Representação esquemática e (II) fotografia ilustrativa do sensor eletroquímico utilizado nas análises por HPLC-EC

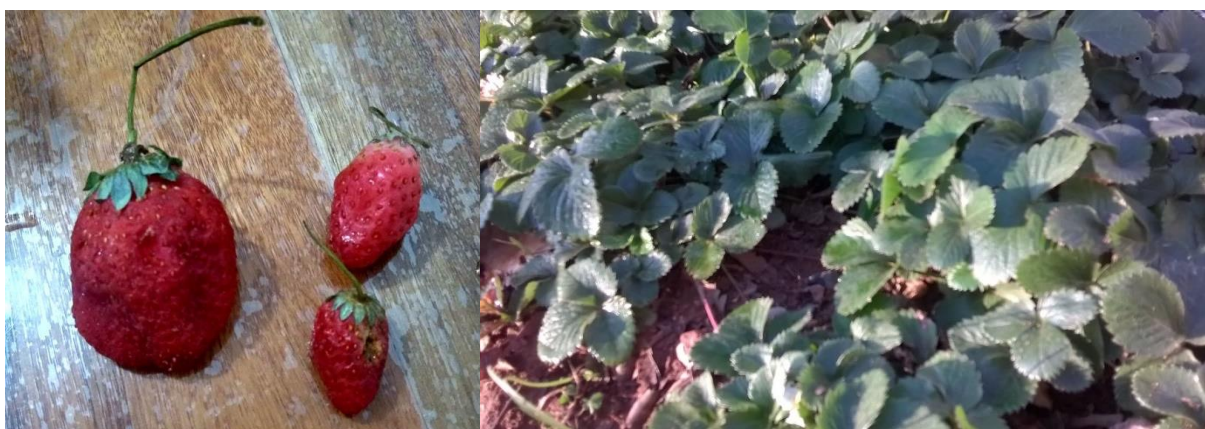


Fonte: (ANDRADE *et al.*, 2009).

3.4-MORANGO ORGÂNICO: PLANTAÇÃO E CULTIVO

As mudas de morango orgânico foram adquiridas de uma produtora rural, que faz o cultivo de morango orgânico para consumo próprio na região de Catalão-GO. A plantação e o cultivo dos morangos foram realizados de “forma orgânica” pela autora, com ausência de qualquer tipo de agrotóxico ou fertilizante comercial. A FIGURA 9 mostra as fotografias obtidas da plantação e de alguns morangos colhidos.

FIGURA 9 - Fotografia da colheita e cultivo do morango orgânico.



Fonte: Elaborada pela autora.

Devido à produção limitada de morangos, dada às dificuldades inerentes ao seu cultivo, optou-se por utilizar o morango orgânico apenas na validação do método (construção da curva de calibração, estudo de recuperação e em amostras do branco) no sentido de garantir as amostras livres de quaisquer interferentes externos (branco). Para os demais experimentos, amostras de morango foram adquiridas no comércio local da cidade de Catalão-GO.

3.5-EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM

As amostras de morango, tanto as cultivadas de maneira orgânica, quanto as adquiridas no comércio local, não foram higienizadas, apenas a parte foliar foi retirada, e assim triturados sem adição de água. A polpa de morango obtida foi armazenada em recipiente de vidro com tampa, e congelada para posterior análise. Alíquotas de 1,0 g dessa polpa foram pesadas e adicionadas em um tubo de vidro com tampa e fundo cônico, juntamente com 1 mL de água desionizada (Milli-Q[®]), e fortificadas com 500 µL de solução padrão do CBZ (1,0 mmol L⁻¹ em metanol) para obtenção da concentração nominal adicionada (C_{ad}). Em seguida, cada tubo foi agitado por 5 min por um agitador de tubos

Vortex 2 - IKA[®]. O sobrenadante (1,2 mL) foi adicionado em uma proveta e completado o volume com água desionizada (Milli-Q[®]) a 5,0 mL. Esse volume foi adicionado em um novo tubo, onde foi adicionado 0,5 mL do surfactante Tergitol TMN-6 10% (em água). As alíquotas foram deixadas em um banho termostático a 45 °C por 45 min sendo, ao mesmo tempo, submetidas a uma radiação ultrassônica com frequência de 20 kHz. Em seguida, 0,2 g de NaCl foram adicionados em cada amostra e finalmente as alíquotas foram centrifugadas a 4000 rpm por 3 min. Volumes de 100 µL da fase rica em surfactante foram diluídos com 100 µL da fase móvel ($F_D = 2$), e volumes de 20 µL de cada solução resultante foram injetados no sistema HPLC-EC. Define-se aqui, portanto, a C_{ad} como sendo a concentração do CBZ adicionada à poupa de morango, antes da extração/pré-concentração por ponto nuvem, enriquecida com a adição do padrão CBZ. Todas as concentrações nominais investigadas neste trabalho foram selecionadas respeitando-se os valores máximos de solubilidade em meio aquoso do CBZ, 8 mg L⁻¹ em pH 7 e 29 mg L⁻¹ em pH 4 (MELGAR, 2009).

O fato da eficiência da EPN ser função de cada parâmetro de investigação faz com que a C_{ad} não seja necessariamente igual a concentração obtida (C_{ob}). Em outras palavras, a C_{ob} será diretamente dependente da eficiência dos processos de extração/pré-concentração em ponto nuvem, os quais levam em conta fatores de diluição e de pré-concentração. Desta forma, define-se a C_{ob} como sendo:

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

Onde C_C é a concentração do analito determinada pela curva analítica, obtida sem qualquer processo de extração, F_D é o fator de diluição ($F_D = 2$) e F_C o fator de pré-concentração (ver seção 1.2.2).

Uma vez determinados os valores das concentrações obtidas (C_{ob}), as eficiências de recuperação percentual (R%) do CBZ foram determinadas de acordo com a Equação 3.

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

3.5.1-VARIAÇÃO DO pH DA AMOSTRA

A influência do parâmetro de pH das amostras do sobrenadante da polpa do morango foi investigada nos valores de 3, 4, 5, 6, 7 e 8. Alíquotas de 1,0 g de poupa de morango foram pesadas e adicionadas em um tubo de vidro com tampa e fundo cônico,

juntamente com 1 mL de água desionizada (Milli-Q[®]), e fortificadas com 500 µL de solução padrão do CBZ (1,0 mmol L⁻¹ em metanol) para obtenção da concentração nominal adicionada (C_{ad}). Em seguida, cada tubo foi agitado por 5 min por um agitador de tubos Vortex2 - IKA[®]. O sobrenadante teve o pH acertado com soluções de HCl ou NaOH, sendo em seguida transferido a uma proveta e completado o volume com água desionizada a 10,0 mL. Esse volume foi adicionado em um novo tubo, onde foi adicionado 1,0 mL do surfactante Tergitol TMN-6 10 % (em água). As alíquotas foram deixadas em um banho termostático, e seguiu em sequência como descrito na seção 3.5.

3.5.2-PLANEJAMENTO FATORIAL 2⁴ e CCD

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

3.6 - ESTUDO DE RECUPERAÇÃO: PRECISÃO E EXATIDÃO DO MÉTODO

Para o estudo de recuperação, as amostras de morango orgânico foram submetidas à EPN nas condições otimizadas (seções 3.5.1 e 3.5.2), analisadas em quintuplicada e em três níveis de concentrações 2,0 µmol L⁻¹, 5,0 µmol L⁻¹ e 10,0 µmol L⁻¹. Os estudos de precisão e exatidão foram realizados em três dias consecutivos. A precisão do método foi expressa pelo coeficiente de variação percentual (CV%) das replicadas. A exatidão foi calculada por meio da razão da média das concentrações encontradas e o valor médio das concentrações nominais, e foi expressa em porcentagem.

3.7 - ESTUDO DE INTERFERENTE

O método proposto foi avaliado quanto à presença de um agrotóxico como interferente, o clorpirifós (CPF) em amostras de morango comercial. O CPF é um inseticida organofosforado, que ocupa o terceiro lugar dentre os agrotóxicos não autorizados detectados em concentrações iguais ou superiores a 0,01 mg/kg, nas amostras monitoradas de morango entre 2013 e 2015 (ANVISA, 2016). Além disso, dos alimentos monitorados no Primeiro ciclo do plano plurianual 2017-2020, (referente ao período de 2017 e 2018, aos quais não incluem o morango), o CPF apresentou o segundo maior índice de detecção irregular entre os

pesticidas analisados, e ainda o maior número de detecções para as quais não existem LMR estabelecido (ANVISA, 2019).

Para o estudo de interferente, as amostras de morango comercial foram submetidas à EPN nas condições otimizadas e em diferentes situações: a) Sem a adição de qualquer fungicida (branco); b) com adição de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CBZ ; c) somente com adição de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ CPF; d) com a adição de CBZ e CPF na mesma concentração ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) e e) com a adição de CPF em concentração dez vezes maior que a do CBZ. Em seguida, procedeu-se a análise por HPLC-EC para verificar o efeito do interferente no método desenvolvido.

3.8 - APLICAÇÃO DO MÉTODO

3.8.1 – AMOSTRAS COMERCIAIS

Com a finalidade de identificar se as amostras de morango adquiridas no comércio local estão em conformidade em relação à quantidade de agrotóxico CBZ e tiofonato-metílico permitidos por lei, cujos resíduos são expressos em CBZ, após realizada a validação do método proposto, foram adquiridas amostras de morango de três estabelecimentos comerciais distintos e localizados na cidade de Catalão-GO, as quais foram denominadas de Comercial I, Comercial II, e Comercial III.

Foram separadas quantidades de 100 g de cada amostra as quais foram, em seguida, trituradas e submetidas à EPN. Uma amostra de morango orgânico foi usada como branco. As amostras foram fortificadas ($C_{ad} = 5 \mu\text{mol L}^{-1}$), e não fortificadas. Todas as análises foram feitas em triplicata e nas condições previamente otimizadas.

3.8.2 – TESTE DE LAVAGEM DE AMOSTRA COMERCIAL DE MORANGO CONTAMINADAS POR CBZ.

Neste procedimento, 100 g de amostras de morango comercial foram borrifadas com 5 mL de solução metanólica de CBZ 2 mmol L^{-1} , obtendo uma concentração nominal de 20 mg de CBZ por cada /1 kg de morango. Essa concentração foi escolhida para garantir que, ao final do processo, o sinal do CBZ fosse maior do que o LQ obtido para o método proposto e fosse possível analisar a eficiência da lavagem. A secagem foi feita em temperatura ambiente por 6 h em capela de exaustão. Após a secagem, as amostras passaram por ação de lavagem, exceto o controle.

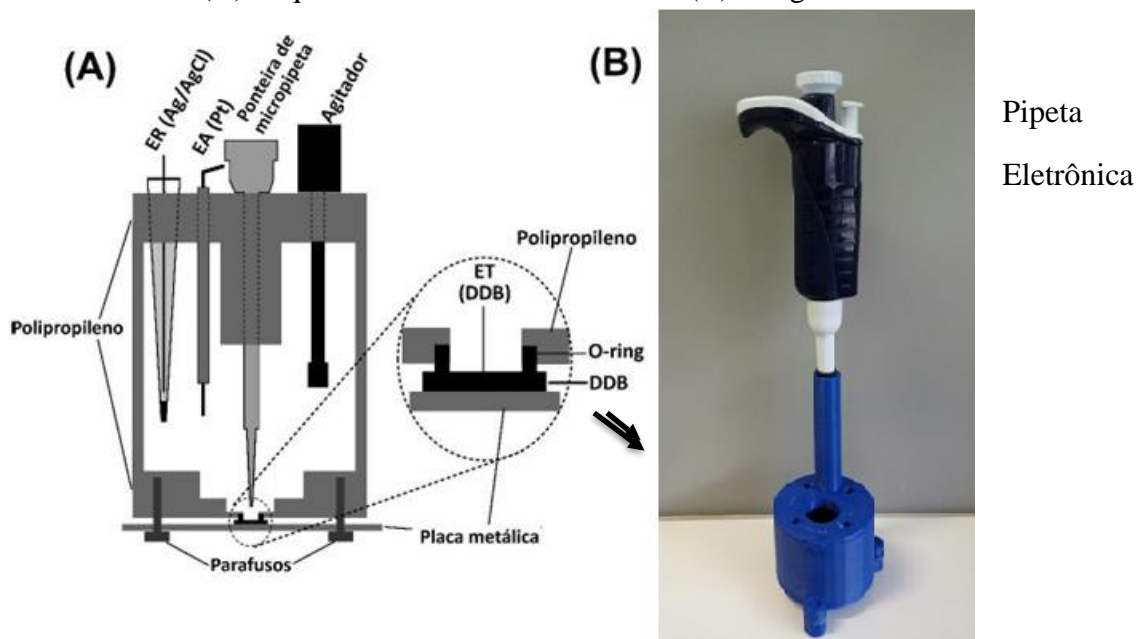
As ações de lavagem foram selecionadas baseadas em ROCHA, *et al.*, 2010. Assim, as amostras foram submersas por 15 min nos seguintes veículos: (a) água e posterior lavagem em água corrente; (b) solução aquosa de detergente comercial 1% (v/v) e posterior

lavagem em água corrente; (c) solução aquosa de bicarbonato de sódio 0,1% (m/v) e posterior lavagem em água corrente; (d) solução aquosa de água sanitária 1% (v/v) de cloro ativo e posterior lavagem em água corrente. Em seguida, as amostras foram trituradas, submetidas à metodologia otimizada de extração por ponto nuvem (em triplicata) e analisadas por HPLC-EC.

3.9–SISTEMA BIA-SWV

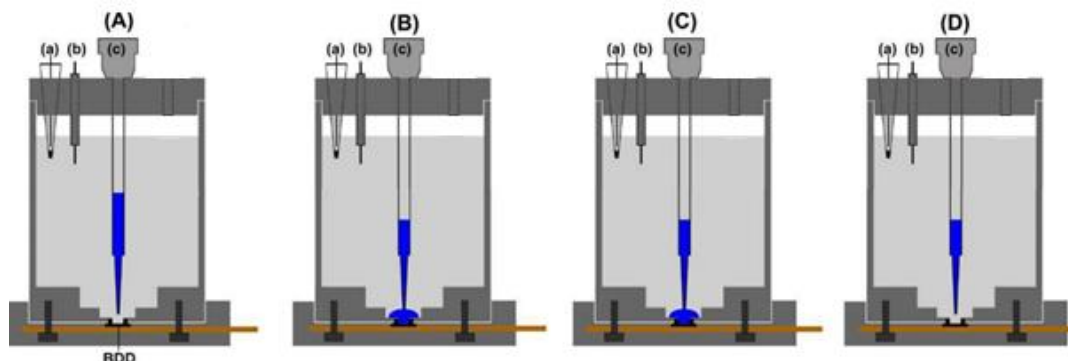
Os experimentos foram realizados em uma célula tipo BIA (FIGURA 10) com capacidade de até 100 mL. No sentido de evitar respingos durante a agitação e promover a diluição do analito, optou-se por trabalhar com um volume de 80 mL. Uma micropipeta eletrônica motorizada PIPETMAN® M P300M foi utilizada nas injeções. Esta pipeta permite efetuar injeções de volumes que variem entre 20 µL e 300 µL e com velocidades de injeção que variem de 10 µL s⁻¹ a 210 µL s⁻¹. A FIGURA 11 mostra um esquema de como geralmente ocorre a análise em um sistema BIA- SWV.

FIGURA 10 -(A) Esquema de uma célula de BIA e (B) fotografia da célula do BIA.



Fonte:(A) (FREITAS, 2015; TORMIN *et al.*, 2011) e (B)Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 11 - Esquema mostrando um procedimento de análise com o sistema BIA-DPV: (a) eletrodo de referência; (b) eletrodo auxiliar; (c) ponteira da micropipeta. Os estágios do procedimento são: (A) Etapa de condicionamento; (B) etapa de injeção; (C) aplicação da DPV; (D) sistema BIA-DPV pronto para uma nova injeção.



Fonte: Adaptado pela autora (SILVA, 2017).

Na ETAPA (A), um potencial de condicionamento (opcional) é aplicado ao eletrodo de trabalho. Em (B) uma alíquota de solução amostra é injetada sobre a superfície do eletrodo de trabalho com solução no interior da célula no estado estacionário (a alíquota injetada permanece junto ao eletrodo). Na ETAPA (C), a varredura por DPV é realizada na faixa de potencial selecionada e em (D) a solução no interior da célula BIA é agitada para que a alíquota injetada seja removida da superfície do eletrodo por meio da dispersão. Após essa etapa, um novo procedimento de análise pode ser realizado.

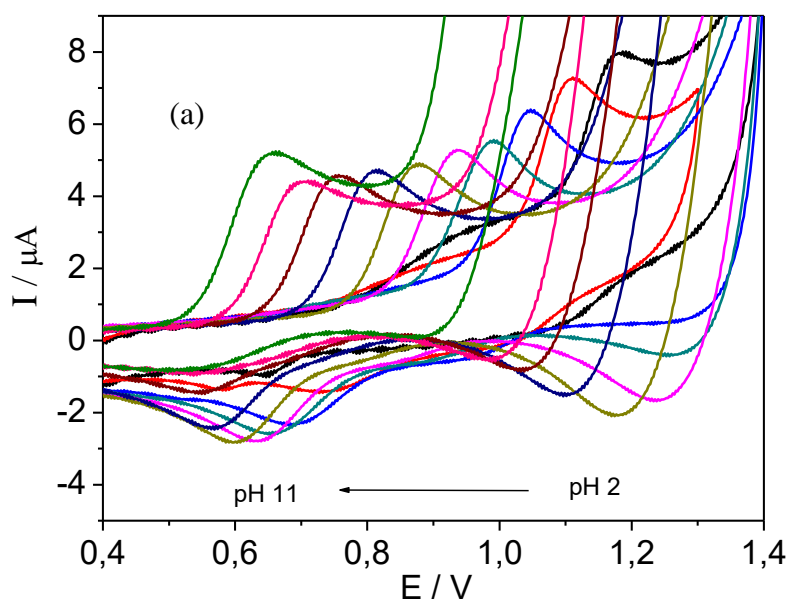
A otimização dos parâmetros referentes ao método BIA foi feita em eletrólito KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 10,0) e utilizando uma solução de CBZ com concentração de $1,00 \mu\text{mol L}^{-1}$, diluído no eletrólito. A velocidade de injeção foi otimizada variando-se seu valor em $10 \mu\text{L s}^{-1}$, $20 \mu\text{L s}^{-1}$, $40 \mu\text{L s}^{-1}$, $70 \mu\text{L s}^{-1}$, $120 \mu\text{L s}^{-1}$ e $210 \mu\text{L s}^{-1}$. Após determinada a melhor condição de velocidade de injeção, seu valor foi fixado, e variou-se o volume de injeção entre $20 \mu\text{L}$ e $100 \mu\text{L}$.

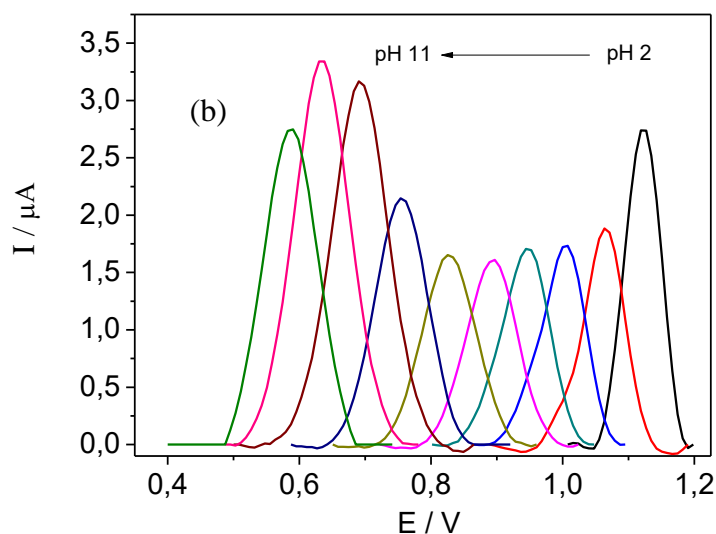
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICO E DE PULSO DIFERENCIAL

Os perfis voltamétricos do CBZ foram determinados utilizando como eletrólito suporte solução de KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH. A determinação do perfil voltamétrico tem como principal função gerar informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos de oxirredução do analito, além de demonstrar se o processo é reversível ou não. A FIGURA 12 mostra os resultados das medidas de CV (FIGURA 12 (a)) e de SWV (FIGURA 12 (b)) para o CBZ sobre o eletrodo de DDB, de acordo com as condições descritas na Seção 3.2. As medidas da FIGURA 12 (a) são mostradas individualmente com seus respectivos brancos no apêndice A.

FIGURA 12 – (a) Voltamogramas cíclicos do CBZ ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e (b) Voltamogramas de pulso diferencial do CBZ ($5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$), Amplitude 50 mV ; Escada de potencial $5,0 \text{ mV}$ e tempo de intervalo de $0,1 \text{ s}$. Eletrólito suporte: KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

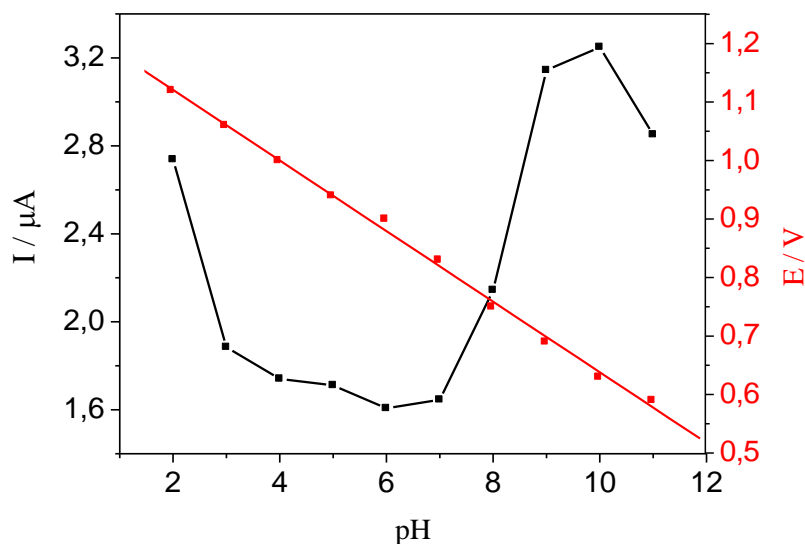




Conforme pode ser observado nos voltamogramas cíclicos mostrados na FIGURA 12 (a), o CBZ apresenta perfis voltamétricos com oxidação e redução em todos os pH investigados. Nos CV obtidos em pH 2 e 3 (apêndice A), foram observados a formação de picos de oxidação e de redução em cada CV não correspondentes ao CBZ. Os picos anódicos observados na região entre 0,8 a 1,0 V podem ser atribuídos à oxidação de grupos de carbono sp^2 presentes na superfície do eletrodo já que nas medidas de CV do branco eles também foram observados. Os picos catódicos observados para ambos os pH 2 e 3 foram observados somente nas medidas que foram adicionados o CBZ. Após a região de potencial dos picos de oxidação do CBZ, observa-se um aumento exponencial da corrente registrada para todos os pH, o qual é característico da reação de desprendimento de oxigênio (RDO) promovida pela oxidação eletroquímica da água.

Do ponto de vista da sensibilidade (maior sinal de corrente, ou seja, I_p), os sinais de corrente anódica (avaliados por SWV, FIGURA 12 (b)) mostraram que a medida realizada em pH 10 apresentou o maior registro de corrente de pico ($3,25 \mu A$). A FIGURA 13 mostra o efeito da variação do pH em relação aos potenciais e correntes de pico anódicos (oxidação do CBZ) obtidos das medidas realizadas por SWV (FIGURA 12 (b)).

FIGURA 13 – Efeito da variação do pH em relação aos potenciais e correntes de pico anódicos obtidos por SWV. Amplitude 50 mV, Escada de potencial 5,0 mV e tempo de intervalo de 0,1 s.

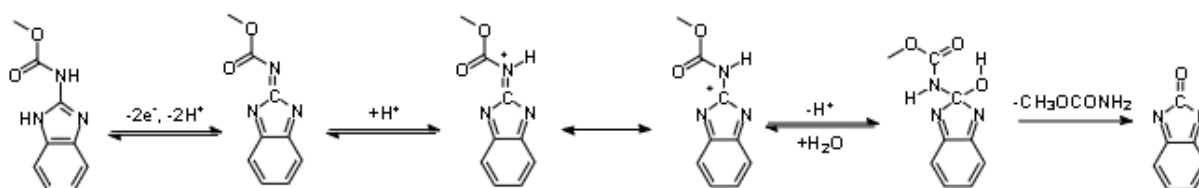


Observa-se na FIGURA 13 que com o aumento do pH do meio ocorreu um deslocamento para valores menos positivos de potenciais. Este comportamento é típico de processos em que ocorre prévia protonação da espécie (CABRAL, 2003). A relação linear observada entre o potencial de pico e o pH foi confirmada a partir do coeficiente de correlação obtido ($R = 0,999$) e com a seguinte equação de reta: $E_p = 1,24 \text{ V} - 0,060 \text{ V/pH}$. A inclinação de 60 mV/década indica que a oxidação envolve a transferência de um mesmo número de prótons e elétrons para o processo de oxidação eletroquímica do CBZ (COSTA, 2017).

De acordo com a literatura (RADI, 2004), outros compostos pertencentes à família dos benzimidazóis podem ser oxidados com a participação de um elétron originando um cátion radical, além de decomposição por reações de natureza química, tais como fragmentação ou rearranjo. A função amina da porção benzimidazol é o grupo mais facilmente oxidável na molécula do CBZ (RADI, 2004; SILVA, 2014).

O mecanismo para a oxidação eletroquímica do CBZ foi proposto por ASHRAFI (2012), FIGURA 14, onde o pico de oxidação foi atribuído à oxidação da ligação dupla do carbamato, envolvendo dois prótons e dois elétrons e levando à formação de uma amida (carbamato de metila $\text{NH}_2\text{COOCH}_3$) e a benzimidazolona.

FIGURA 14 – Mecanismo de oxidação do CBZ.



Fonte: Elaborada pela autora.

Em relação à corrente, houve uma diminuição gradativa da I_p até pH 6. O fungicida CBZ possui pKa de 4,2, desta forma, em pH menor que este, uma espécie protonada de CBZ pode ser formada (MAZELLIER, 2002). A partir do pH 7 houve um aumento da I_p , atingindo o máximo em pH 10 como já mencionado. Quando o pH é maior que o pKa, a molécula está majoritariamente, em sua forma neutra, o que favorece a aproximação na superfície do eletrodo de DDB, que devido ao pré-tratamento catódico, se encontra com terminações de hidrogênio (DE AMORIM & ANDRADE, 2017; ANDRADE *et al.*, 2009).

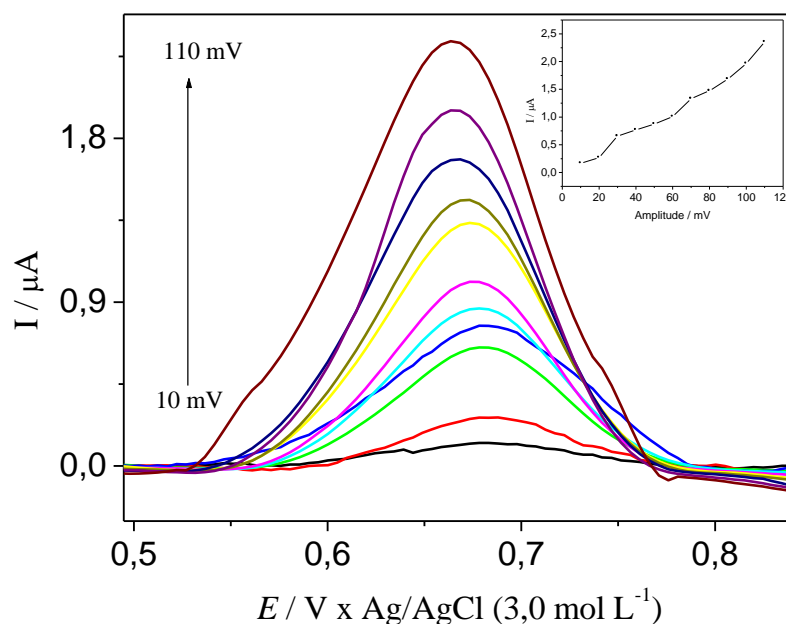
4.2- OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES SWV

4.2.1- AMPLITUDE E ESCADA DE POTENCIAL

Na SWV, parâmetros tais como a amplitude e escada de potencial devem ser cuidadosamente avaliados. Nesse sentido, a FIGURA 15 mostra os SWV obtidos para a obtenção da melhor condição do parâmetro amplitude. Para isso, os valores do tempo de intervalo entre cada pulso e da escada de potencial foram fixados em 0,1 s e 5,0 mV, respectivamente, enquanto a amplitude foi variada de 10 mV a 110 mV.

Verifica-se nos voltamogramas da FIGURA 15 (e no gráfico inserido) um aumento da corrente de pico com a amplitude, o que denota um aumento na sensibilidade. Por outro lado, o aumento da amplitude também leva a um aumento na largura de base do pico, o que diminui sua faixa de seletividade. Portanto, de acordo com os dados voltamétricos mostrados na FIGURA 15, a condição de amplitude de potencial onde se obtém maior sensibilidade e menor perda de faixa de seletividade foi considerada ser de 100 mV, sendo este valor considerado como a melhor condição para estas análises.

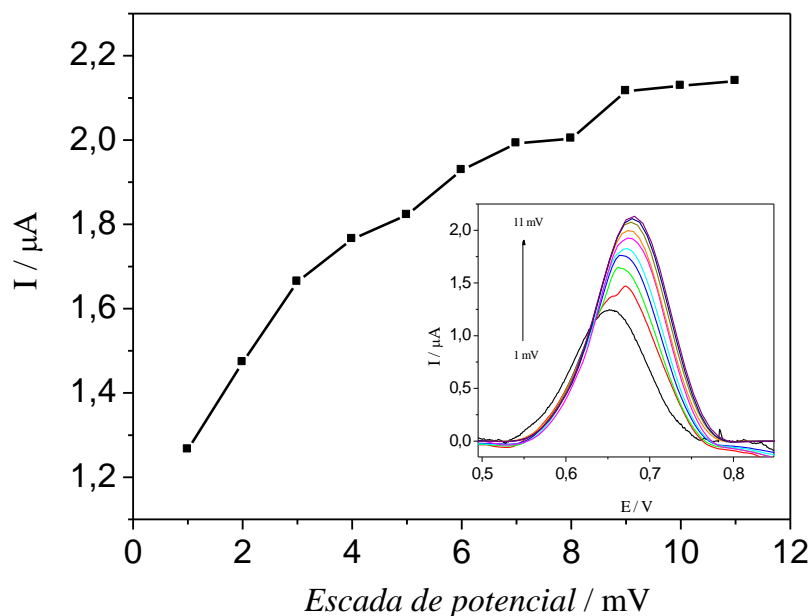
FIGURA 15 - SWV com variação de amplitude. CBZ $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 10). Escada de potencial $5,0 \text{ mV}$ e tempo de intervalo de $0,1 \text{ s}$.



Após a obtenção da melhor condição do parâmetro de amplitude, o mesmo foi feito para o parâmetro voltamétrico de escada de potencial. Para isso, fixou-se a amplitude na melhor condição (100 mV) e o tempo de intervalo entre cada pulso ($0,1 \text{ s}$), variando-se os valores de escada de potencial entre 1 mV e 11 mV . Os resultados dessa medida são mostrados na FIGURA 16.

De acordo com a FIGURA 16, considerando-se um balanço entre o sinal analítico (corrente) e a largura de pico (resolução), o valor de 8 mV foi escolhido como a melhor condição. Como o valor do tempo de intervalo entre cada pulso é sempre mantido constante ($0,1 \text{ s}$), é importante mencionar a velocidade de varredura de potencial nesta medida é 80 mV s^{-1} , uma vez que se trata da razão entre a escada de potencial e o tempo de intervalo entre cada pulso. Como a varredura de potencial destas medições compreende 350 mV (500 mV a 850 mV), o tempo gasto para realização de cada medida é de apenas $4,375 \text{ s}$, o que torna a frequência analítica bastante elevada (~ 14 análises/min).

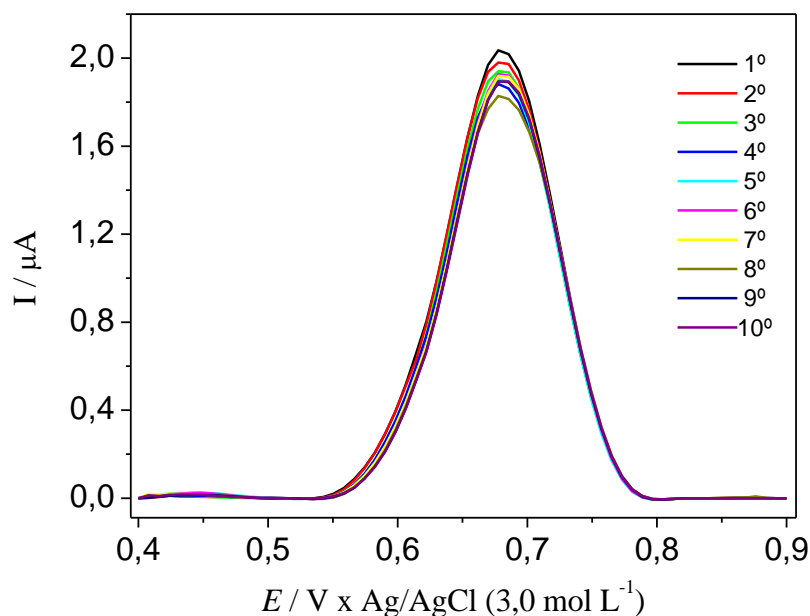
FIGURA 16 - SWV com variação de escada de potencial. CBZ $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 10). Amplitude 100 mV e tempo de intervalo de 0,1 s.



4.2.2 - REPETITIVIDADE

Com as melhores condições definidas para a SWV, foi realizado o teste de repetitividade para verificar o grau de concordância entre os resultados com variabilidade aceitável. Sendo assim, análises nas mesmas condições foram realizadas para visualizar o comportamento do fungicida CBZ, frente a uma série de medidas sucessivas, as quais estão mostradas na FIGURA 17.

FIGURA 17 – Teste de repetitividade para a técnica de SWV. [CBZ] = 5,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em KH_2PO_4 (0,01 mol L^{-1} , pH 10), amplitude de 100 mV, escada de potencial de 8 mV ($\nu = 80 \text{ mV s}^{-1}$).

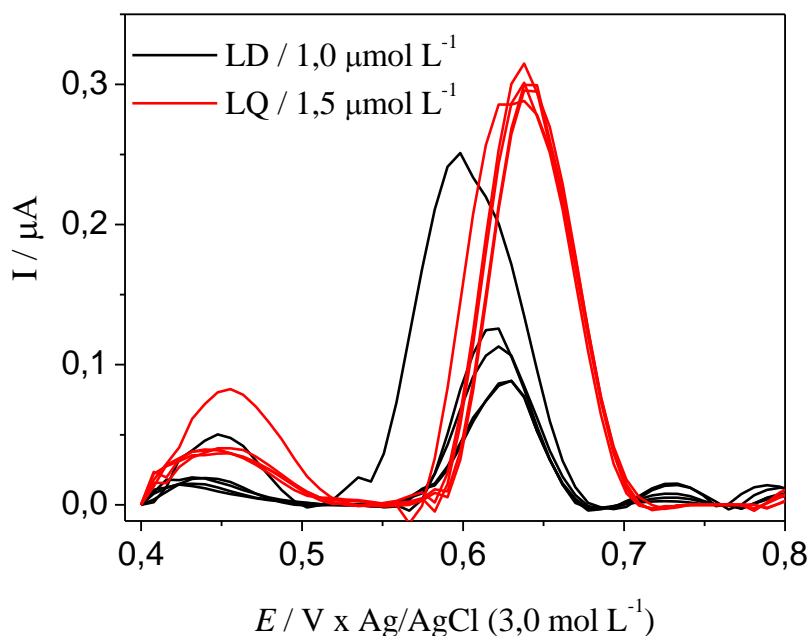


De acordo com os resultados mostrados na FIGURA 16, para 10 medidas em um intervalo de confiança de 95% ($t_{crit} = 2,262$) e desvio padrão relativo de 2,78%, obteve-se um valor médio de $1,916 \pm 0,03805 \mu\text{A}$. Os resultados encontrados confirmam que os parâmetros escolhidos para a técnica de SWV foram satisfatórios para a detecção do fungicida CBZ sobre o eletrodo de DDB.

4.2.2-LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO (SWV)

O limite de detecção (LD) foi definido como sendo a concentração correspondente ao sinal de detecção de, no mínimo, 3 vezes maior que o sinal do ruído. O voltamograma obtido no qual foi determinado o LD está mostrado na FIGURA 18 e seu valor foi de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($0,19 \text{ mg L}^{-1}$).

FIGURA 18 - Voltamograma obtido referente à determinação do LD e LQ do CBZ. Eletrólito suporte: em KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 10), amplitude de 100 mV, escada de potencial de 8 mV ($\nu = 80 \text{ mV s}^{-1}$).

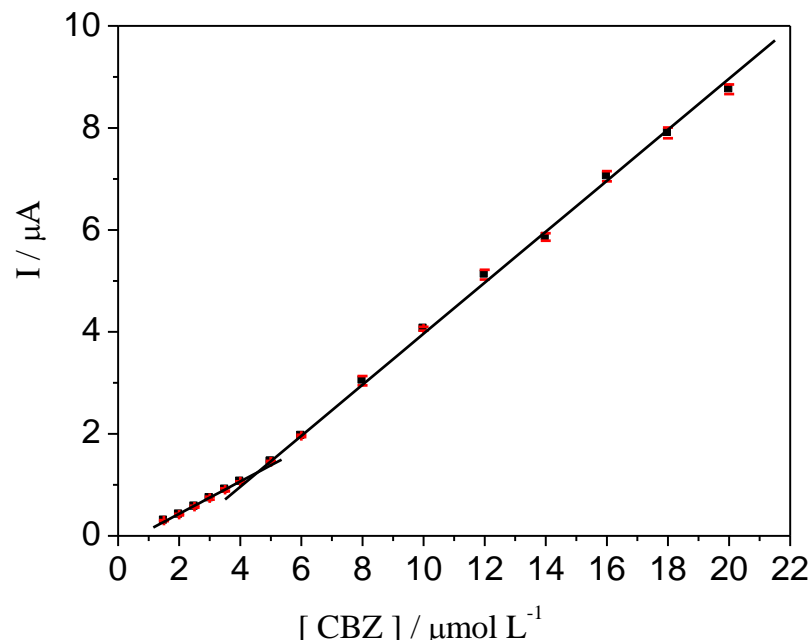


O LQ foi definido como a menor concentração da espécie analítica cujo sinal analítico pode ser quantificado com reprodutibilidade de pelo menos 75%, sem sofrer variação do E_p , em medidas realizadas em quintuplicada. Sendo assim, o valor de LQ obtido para o CBZ, nessas condições foi de $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (ou $0,26 \text{ mg L}^{-1}$), com coeficientes de variação de 0,97 %.

4.2.3-CURVA ANALÍTICA (SWV)

Uma vez determinado o LQ do CBZ ($1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) para a técnica de SWV, foi construída a curva analítica. Para isso, a média dos sinais das alturas dos picos de corrente ($E_p = 0,68 \text{ V}$), obtida a partir dos voltamogramas em quintuplicada, foi lançada em gráfico em função das respectivas concentrações nominais. A FIGURA 19 mostra a curva analítica obtida no intervalo de concentração de $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ para as soluções dos padrões do CBZ.

FIGURA 19 - Curva analítica do CBZ obtida por SWV. Eletrólito suporte: KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 10), amplitude de 100 mV, escada de potencial de 8 mV ($\nu = 80 \text{ mV s}^{-1}$).



De acordo com a curva analítica obtida para a determinação do CBZ mostrada na FIGURA 19, pode-se observar que ela apresenta excelente linearidade nas duas faixas estudadas, a primeira entre $1,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e $5,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (I), e a segunda entre $5,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (II) com coeficientes de correlação igual a 0,998 e 0,999 respectivamente. As equações de reta obtidas pela regressão linear para cada conjunto de pontos mostrados na FIGURA 19 são mostradas abaixo:

$$I / \mu\text{A} = -0,19963 \mu\text{A} + 0,31675 \mu\text{A} / \mu\text{mol L}^{-1} [\text{CBZ}] / \mu\text{mol L}^{-1} \quad (\text{I})$$

$$I / \mu\text{A} = -1,03785 \mu\text{A} + 0,50018 \mu\text{A} / \mu\text{mol L}^{-1} [\text{CBZ}] / \mu\text{mol L}^{-1} \quad (\text{II})$$

4.3 - HPLC-EC

4.3.1 - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

O uso da técnica de HPLC, previamente às medidas eletroquímicas, é interessante para as análises em amostras reais uma vez que permite ser averiguado o quanto uma matriz pode interferir nas medidas eletroquímicas. Para isso, a EPN foi realizada em amostras de morango comercial, sem a otimização de nenhum parâmetro da EPN, apenas para haver um extrato com interferentes da matriz, tal como descrito na Seção 3.3.1.

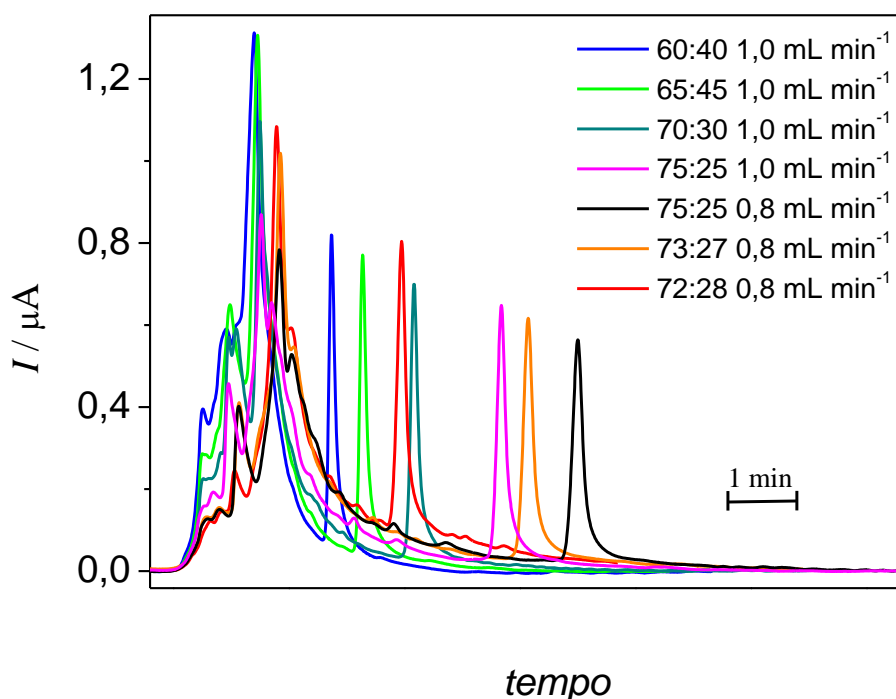
Dessa forma, as condições cromatográficas de composição da fase móvel e vazão foram investigadas a fim de se obter uma condição que resultasse em

cronoamperogramas (perfis de corrente elétrica x tempo) com picos bem definidos, separados e com tempos de análise adequados. Os parâmetros cromatográficos investigados foram composição de fase móvel (Tampão fosfato: ACN) nas respectivas proporções volumétricas de 75:25, 73:27, 72:28, 70:30, 65:45 e 60:40 (V/V) e vazão (1,0 mL min⁻¹ e 0,8 mL min⁻¹).

O pH do tampão fosfato usado para essas medidas foi ajustado para 4. Essa escolha de não usar o pH 10 (definido como melhor pH no item 4.1) ocorreu devido ser uma condição extrema tanto para a coluna cromatográfica usada nas medidas (faixa de pH indicada de 2 a 8), quanto para o equipamento de modo geral. Dessa forma, as FIGURAS 12 e 13 foram novamente avaliadas restringindo a escolha do melhor pH, observando a faixa de 3 a 7 para evitar a exposição do equipamento e da coluna às condições extremas. Assim, as medidas que apresentaram maior sinal analítico foram em pH 3 e pH 4. O pH 4 foi escolhido devido a maior solubilidade do CBZ em meio aquoso nesta condição (MELGAR, 2009).

As medidas amperométricas do sistema conjugado HPLC-EC foram realizadas em potencial fixo de 1,4 V x Ag/AgCl. Esse potencial foi escolhido por ser um valor um pouco superior ao potencial de pico observado no voltamograma cíclico do CBZ (FIGURA 12 (a)). Os resultados obtidos são mostrados pela FIGURA 20.

FIGURA 20 - Variação do sinal analítico do CBZ após a EPN com adição de 100 μL de CBZ (20 μmol L⁻¹) reconstituído na fase móvel, em diferentes composições de fase móvel e vazão. $E = 1,4 \text{ V x Ag/AgCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$. Volume de injeção = 20 μL.



As condições cromatográficas de composição de fase móvel de 60:40 (V/V) e vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ foram usadas inicialmente considerando-se que, em testes prévios, esta foi a condição que resultou em cromatogramas com os picos de melhor resolução, o que proporciona também cronoamperogramas de maior sensibilidade. Entretanto, como observado na FIGURA 20, nesta condição não houve uma boa separação do CBZ e os interferentes da matriz. Para resolver este problema, optou-se por aumentar gradativamente a proporção de tampão fosfato, até a proporção de 75:25 (Tampão fosfato:ACN), o que diminui a força da fase móvel, aumentando o tempo de retenção do CBZ.

No entanto, a variação da composição de fase móvel não foi suficiente para que houvesse a separação adequada entre o analito e os interferentes da amostra. Dessa forma, optou-se por diminuir a vazão para $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ mantendo-se a fase móvel na proporção de 75:25 (curva em preto). Nessa condição, obteve-se uma melhor separação do CBZ dos interferentes. A diminuição da proporção de tampão fosfato na fase móvel, por um lado, resultou em mudanças positivas, dado o aumento do sinal de corrente do CBZ (ver curvas laranja e vermelha). Entretanto, tal diminuição resultou em uma pior separação entre o analito e os interferentes da amostra. Desta forma, observa-se que a melhor separação ocorre na proporção 75:25 (Tampão fosfato:ACN), sendo esse valor usado nos experimentos posteriores.

4.4-EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM

4.4.1 - VARIAÇÃO DO pH DAS AMOSTRAS DE MORANGO

Sabendo-se que a eficiência do processo de extração e de pré-concentração em ponto nuvem pode ser alterado pelos tipos e concentração dos surfactantes e aditivos, pH da amostra, temperatura, tempo de equilíbrio e condições de centrifugação (ROCHA, 2013), a variação do pH da amostra de morango foi investigada. As alíquotas do sobrenadante da polpa de morango sofreram alteração em sua coloração ao terem o pH corrigido (FIGURA 21) e os resultados da eficiência do processo de extração e de pré-concentração em ponto nuvem pela variação do pH estão mostrados na FIGURA 22.

FIGURA 21 – Fotografia das alíquotas do sobrenadante da polpa de morango em diferentes pH.

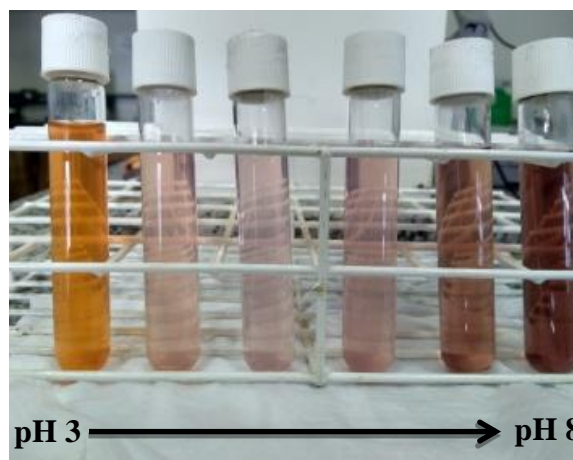
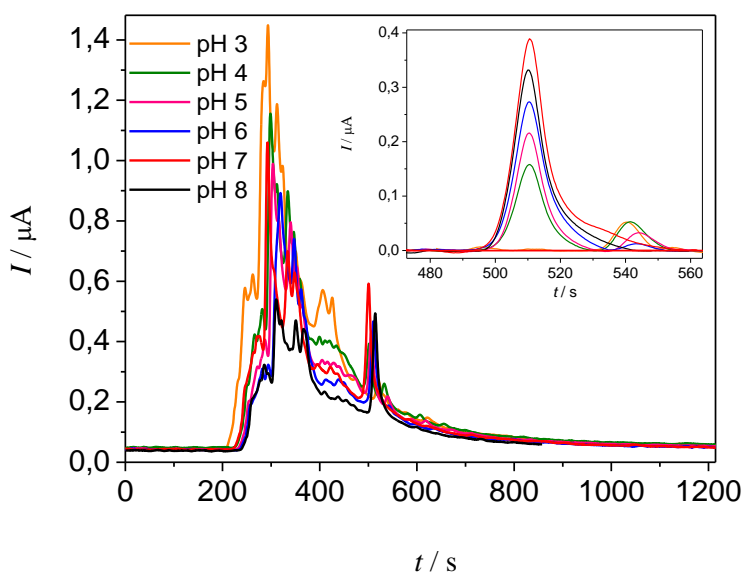


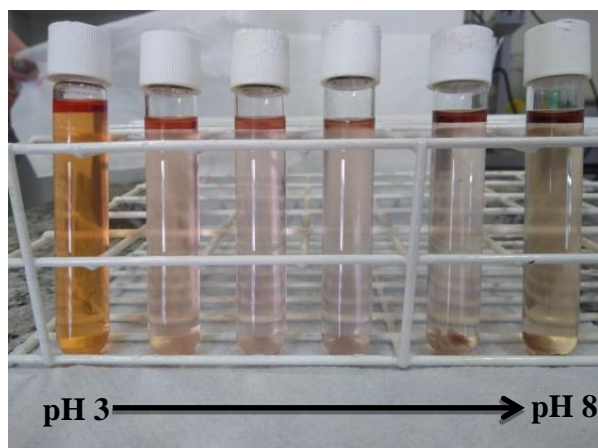
FIGURA 22 - Cronoamperogramas obtidos na determinação do CBZ ($C_a = 60 \mu\text{mol L}^{-1}$) em diferentes pH de amostra de morango. Eletrólito suporte: KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 4,0)/ACN (75:25 V/V) vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,4 \text{ V}$ x Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$.



Com base nos resultados mostrados na FIGURA 22 (Figura inserida) fica evidente que as amostras de morango enriquecidas com CBZ, nas mesmas concentrações, apresentaram maiores intensidades de sinal em pH 7,0. Provavelmente, o pH neutro promove um aumento do sinal analítico porque a quantidade de íons no meio pode interferir no processo de EPN alterando a solubilidade da fase micelar em água. Isso porque a presença de eletrólitos favorece a separação entre a fase rica em surfactante e a fase pobre e, dessa forma,

quanto mais cargas, mais rápida ocorre a separação e, conseqüentemente, as micelas têm menos tempo para carregar consigo os compostos orgânicos (ROCHA, 2013). Outro ponto importante é que, em pH 7,0 e 8,0, após o processo de EPN observou-se a formação de um precipitado (FIGURA 23).

FIGURA 23 – Fotografia das alíquotas do sobrenadante da polpa de morango em diferentes pH após a EPN.

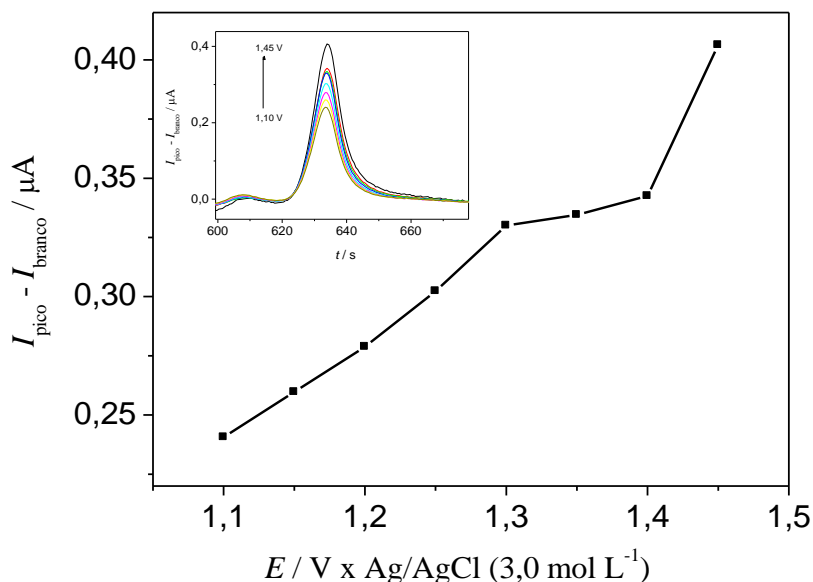


A formação destes precipitados pode ter levado a uma diminuição na quantidade de interferentes da amostra, evidenciado na FIGURA 22, o que de certa forma, pode ter colaborado com maior extração do analito, já que a EPN ocorre com substâncias que estejam solúveis no meio. Dessa forma, todos os ensaios posteriores foram realizados acertando-se o pH das amostras de morango para o valor 7,0.

4.4.2 - VOLTAMOGRAMA HIDRODINÂMICO

Uma vez obtidas as melhores condições cromatográficas e já definido o intervalo de potencial de oxidação do CBZ, bem como o melhor pH no processo de EPN, foi obtida a curva hidrodinâmica na presença dos interferentes. O objetivo dessas medidas é determinar qual o valor de potencial mais adequado que deve ser aplicado na detecção eletroquímica do CBZ, e que eventualmente, os sinais dos interferentes extraídos, junto com o CBZ, tenham baixa resposta eletroquímica. O intervalo de potencial aplicado foi de 1,10 V a 1,45 V x Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹). Os resultados obtidos após subtrair os sinais de corrente de pico obtidos na presença do CBZ (I_{pico}) com os sinais de corrente de fundo obtidos da amostra do branco (I_{branco}), ambos no mesmo potencial, são mostrados pela FIGURA 24.

FIGURA 24- Voltamograma hidrodinâmico do CBZ extraído em amostras de morango pH 7. Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,0)/ACN (75:25 V/V) vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$.



De acordo com o voltamograma hidrodinâmico mostrado na FIGURA 24, foi possível observar que ao aplicar o potencial de $1,10 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) o sinal de corrente aumenta e tende a um patamar até o valor de $1,4 \text{ V}$, possivelmente devido à limitações por transporte de massa. Acima deste valor, a corrente de pico registrada volta a aumentar, provavelmente devido à contribuição da reação de desprendimento de oxigênio. Portanto, com base nos resultados mostrados na FIGURA 24, pode-se concluir que o potencial aplicado que apresentou a melhor resposta foi de $1,4 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) para o CBZ, sendo esta condição utilizada nos experimentos posteriores.

Em todos os potenciais investigados, os interferentes da matriz também apresentaram resposta eletroquímica, o que demonstra ser inviável a análise direta do CBZ oriundo da EPN.

4.5- OTIMIZAÇÃO DO PONTO NUVEM

Um planejamento fatorial 2^4 completo foi realizado, com o objetivo de otimizar as condições a serem empregadas na extração do CBZ por EPN, em amostras de morango. Os experimentos da EPN foram realizados, em pH 7 (ver Seção 3.5.2) e a detecção por meio de HPLC-EC, nas condições previamente melhor determinadas. Os resultados desse estudo estão apresentados na TABELA 2. Esses resultados foram tratados estatisticamente utilizando a análise de variância ANOVA, mostrados na TABELA 3, com nível de confiança igual a 95%, a partir do qual é obtido o gráfico de Pareto, que demonstra as variáveis com os possíveis

efeitos, apresentado na FIGURA 25. Por meio deste gráfico é possível avaliar o comportamento causado por cada uma das variáveis (efeito principal) e o comportamento causado pela interação entre as variáveis (efeito de interação), ou seja, o que acontece com a resposta quando ocorre a mudança do nível (-) para o nível (+).

TABELA 2 - Resultado do planejamento fatorial 2^4 para estudo da extração e pré-concentração por ponto nuvem do CBZ.

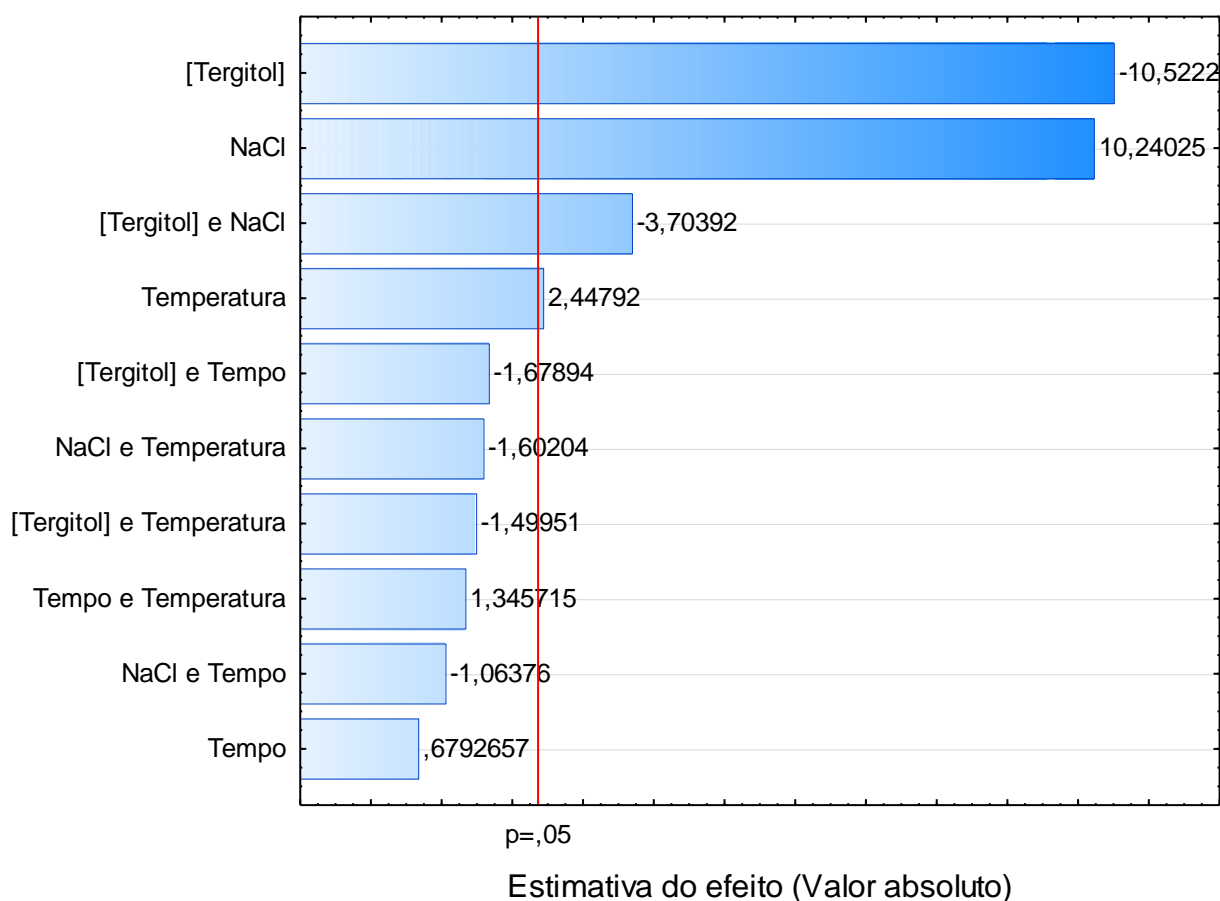
Experimento	Variáveis escalonadas				Corrente (μA)
	Tergitol TMN-6 (% m/V)	NaCl (g)	Tempo (min)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	
1	10 (-)	0,40 (-)	15 (-)	36 (-)	0,162
2	30 (+)	0,40 (-)	15 (-)	36 (-)	0,135
3	10 (-)	0,60 (+)	15 (-)	36 (-)	0,349
4	30 (+)	0,60 (+)	15 (-)	36 (-)	0,218
5	10 (-)	0,40 (-)	45 (+)	36 (-)	0,203
6	30 (+)	0,40 (-)	45 (+)	36 (-)	0,12
7	10 (-)	0,60 (+)	45 (+)	36 (-)	0,313
8	30 (+)	0,60 (+)	45 (+)	36 (-)	0,202
9	10 (-)	0,40 (-)	15 (-)	40 (+)	0,215
10	30 (+)	0,40 (-)	15 (-)	40 (+)	0,153
11	10 (-)	0,60 (+)	15 (-)	40 (+)	0,332
12	30 (+)	0,60 (+)	15 (-)	40 (+)	0,207
13	10 (-)	0,40 (-)	45 (+)	40 (+)	0,252
14	30 (+)	0,40 (-)	45 (+)	40 (+)	0,158
15	10 (-)	0,60 (+)	45 (+)	40 (+)	0,382
16	30 (+)	0,60 (+)	45 (+)	40 (+)	0,194
17 (C)	20 (\pm)	0,50 (\pm)	30 (\pm)	38 (\pm)	0,201
18 (C)	20 (\pm)	0,50 (\pm)	30 (\pm)	38 (\pm)	0,196

TABELA 3 - ANOVA para o planejamento fatorial 2^4 no estudo da extração e pré-concentração por ponto nuvem do CBZ.

Fator	SQ	gl	MQ	F	p
[Tergitol]	0,042128	1	0,042128	110,7169	0,000015
NaCl	0,039900	1	0,039900	104,8627	0,000018
Tempo	0,000176	1	0,000176	0,4614	0,518791
Temperatura	0,002280	1	0,002280	5,9923	0,044242
[Tergitol] e NaCl	0,005220	1	0,005220	13,7190	0,007616
[Tergitol] e Tempo	0,001073	1	0,001073	2,8188	0,137058
[Tergitol] e Temperatura	0,000856	1	0,000856	2,2485	0,177422
NaCl e Tempo	0,000431	1	0,000431	1,1316	0,322752
NaCl e Temperatura	0,000977	1	0,000977	2,5665	0,153180
Tempo e Temperatura	0,000689	1	0,000689	1,8109	0,220349
Erro	0,002663	7	0,002280		
SQ total	0,096391	17			

Os valores da soma dos quadrados (SQ), média dos quadrados (MQ) e graus de liberdade (gl) foram utilizados para determinar a significância dos efeitos principais e dos efeitos de interações para todas as variáveis pelo valor de F. Para um modelo que representa 97,2% dos dados, têm-se que as variáveis que influenciaram significativamente na extração e pré-concentração do CBZ por ponto nuvem, ao nível de 95% de confiança, foram a concentração de Tergitol TMN-6, de NaCl e temperatura, pois o valor de $F_{\text{calculado}}$ para estas variáveis foi maior que o valor de F_{tabelado} (4,494). A interação que apresentou significância no mesmo intervalo de confiança foi entre a concentração do surfactante Tergitol TMN-6 e o NaCl. Os efeitos são melhores evidenciados pelo gráfico de Pareto, mostrado a seguir.

FIGURA 25 - Gráfico de Pareto gerado no planejamento fatorial 2^4 .

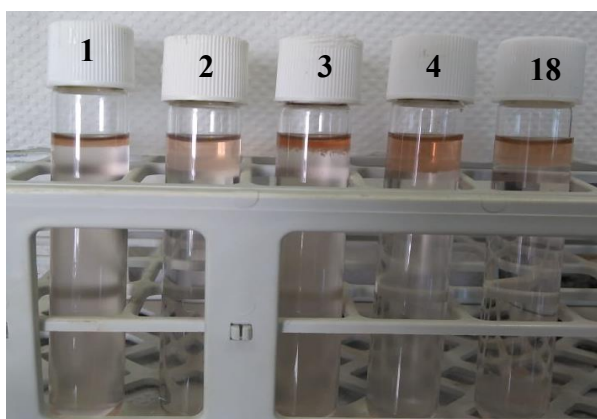


Fonte: Elaborada pela autora, utilizando o programa Statistic.

A EPN depende da concentração do solvente extrator e, dentro dos valores escolhidos, seu efeito foi significativo tanto como efeito principal de interação. Em um primeiro momento, espera-se que quanto maior a concentração do solvente extrator maior a quantidade de analito extraído. Entretanto, o sinal negativo desse efeito observado na FIGURA 25 (-10,5222), indica que o nível baixo de concentração (%Tergitol) proporciona

melhores respostas analíticas. Isso ocorre devido a um maior volume final da fase micelar, obtido com concentrações de surfactante maiores, o que resulta em um efeito de diluição, já que afeta o fator de pré-concentração (F_C), tal como previamente mencionado. A FIGURA 26 ilustra esse fato nos experimentos 2 e 4 em comparação aos experimentos 1 e 3, nas quais os valores de corrente obtidos podem ser consultados a partir da TABELA 2.

FIGURA 26 - Fotografia das alíquotas do sobrenadante da polpa de morango em diferentes concentrações de surfactante após a EPN.

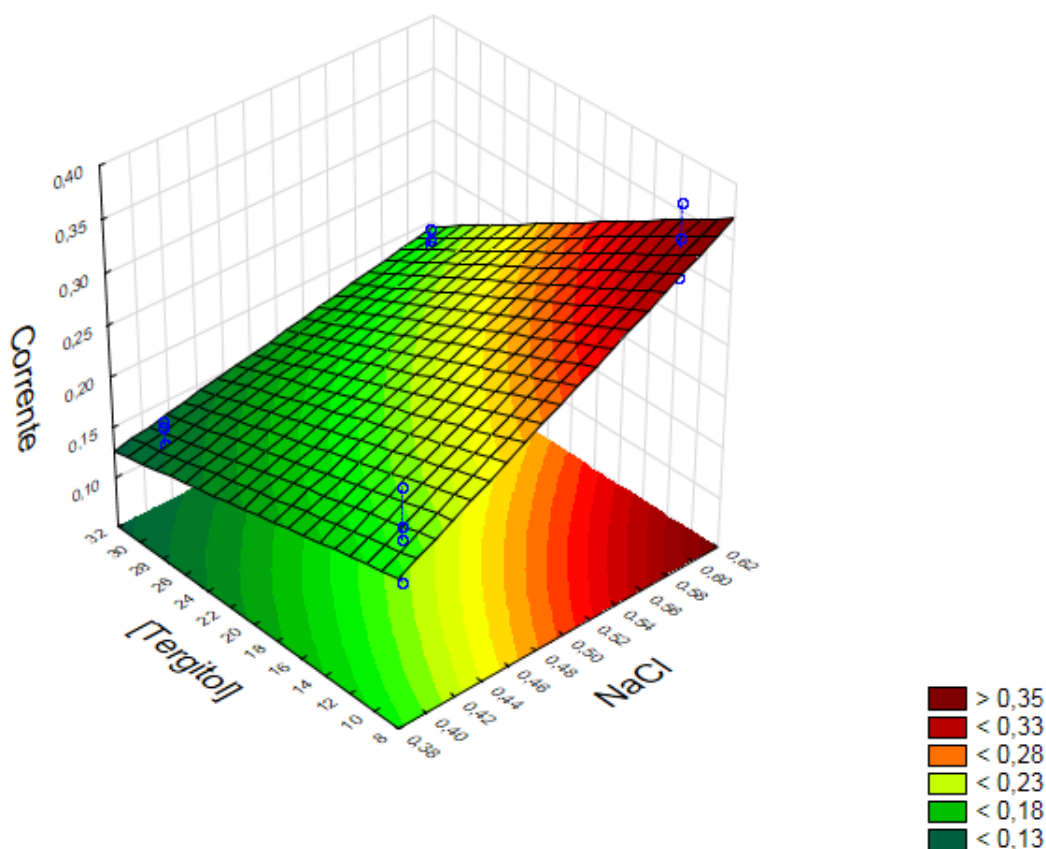


Fonte: Elaborada pela autora.

A concentração do NaCl apresentou efeito positivo sobre o sistema nas condições estudadas. O sinal positivo do efeito indica que melhores respostas são obtidas no nível de maior quantidade de NaCl, uma vez que ele é o responsável por promover a desidratação das cadeias hidrocarbônicas do surfactante, como resultado de interações eletrostáticas mais fortes entre sais e moléculas de água, em comparação com as ligações de hidrogênio entre as cabeças polares do surfactante e as moléculas de água. Ou seja, as moléculas de água solvatam os íons salinos e deixam espaço para as interações de van der Waals entre as moléculas de surfactantes nas micelas, resultando na diminuição na temperatura do ponto nuvem.

Dessa forma, esperava-se que o efeito da interação entre o surfactante e o sal fosse significativo, como de fato foi. O sinal negativo da interação entre as variáveis Tergitol TMN-6 e NaCl evidencia um efeito antagônico, isto é, quando uma variável é mantida no nível alto (+), a outra deve ser mantida no nível baixo (-) para obter melhor sinal analítico. Diante disso, como a variável NaCl apresenta sinal positivo, sua concentração deve ser mantida no nível alto. Já a concentração do Tergitol TMN-6 deve ser mantida em nível baixo (-), tendo em vista que apresentou sinal negativo. A FIGURA 27 evidencia esse fato.

FIGURA 27 - Plano obtido pela combinação das concentrações do NaCl e do Tergitol.



Fonte: Elaborada pela autora, utilizando o programa Statistic.

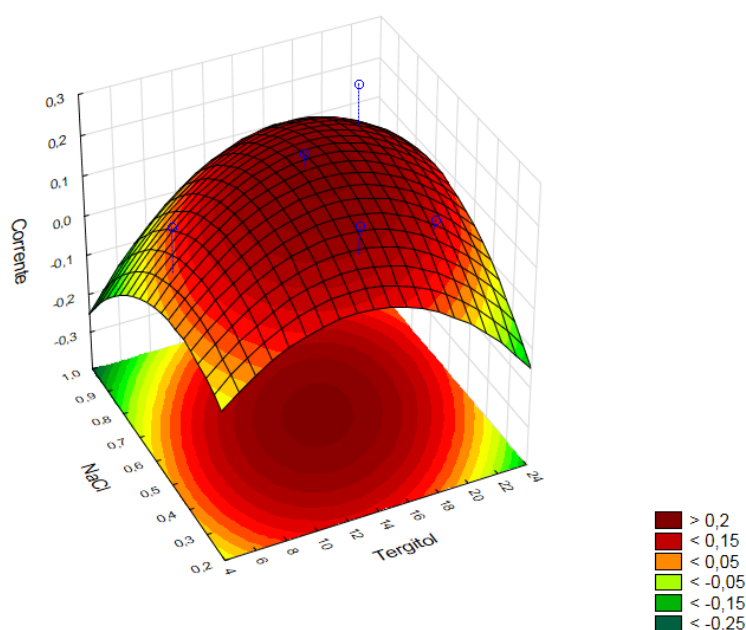
Um novo experimento foi realizado, usando o Planejamento composto central (CCD, da sigla inglesa *Central Composite Design*), para verificar a curvatura do plano obtido pelo planejamento fatorial da FIGURA 26, ou seja, para verificar a existência de termos quadráticos no modelo de regressão. Os experimentos da EPN foram realizados como descrito na Seção 3.5.2, em pH 7 e a detecção por meio de HPLC-EC. Dessa maneira, foi possível propor uma matriz para planejamento de composto central, tal como descrito na TABELA 4. As correntes registradas mostradas na TABELA 4 referem-se aos sinais obtidos nas melhores condições de HPLC-EC já obtidas (fase móvel de KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, $E = 1,4 \text{ V}$ e pH de extração de 7,0).

TABELA 4 - Resultado do planejamento composto central (CCD) para estudo da extração e pré-concentração por ponto nuvem do CBZ.

	Tergitol TMN-6 (% m/V)	NaCl (g)	Corrente (μA)
1	8,0 (-)	0,40 (-)	0,025
2	8,0 (-)	0,80 (+)	0,028
3	20 (+)	0,40 (-)	0,149
4	20 (+)	0,80 (+)	0,174
5 (PC)	14 (0)	0,60 (0)	0,270
6	5,51 ($-\sqrt{2}$)	0,60 (0)	0,031
7	22,5 ($\sqrt{2}$)	0,60 (0)	0,242
8	14 (0)	0,32 ($-\sqrt{2}$)	0,109
9	14 (0)	0,88($\sqrt{2}$)	0,264
10 (PC)	14 (0)	0,60 (0)	0,268

A partir da FIGURA 28, é possível perceber a região de máximo, a qual representa a condição com possibilidade de obtenção de maior sinal de corrente para o CBZ. Essa região é evidenciada pelo destaque na cor vermelha escura do gráfico, a qual revela que a condição ótima foi obtida pelo uso de 0,6 g de NaCl e 14 % de Tergitol TMN-6.

FIGURA 28 - Gráfico gerado através do planejamento de composto central.

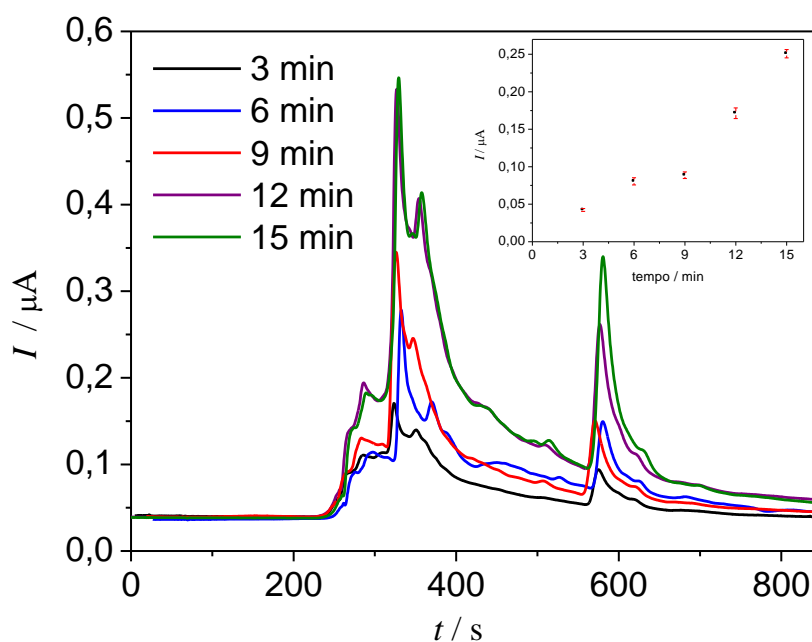


$$z = -0,28651855656597 + 0,044296207316698 * x - 0,0019871527777778 * x^2 + 0,66540183096106 * y - 0,8746875 * y^2 + 0,024583333333333 * x * y$$

Fonte: Elaborada pela autora, utilizando o programa Statistic.

A variável “tempo de banho ultrassônico” usado no processo de EPN, não apresentou efeito significativo, segundo os parâmetros usados no planejamento fatorial. Dessa forma, o tempo para os experimentos do planejamento de composto central foi mantido em nível baixo (15 min). Entretanto, com o intuito de diminuir o tempo de preparo de amostra, optou-se por realizar um novo experimento univariado, com relação ao tempo, nas condições já otimizadas pelo CCD, mantendo o teor de Tergitol em 14% (m/V) e o sal em 0,6 g. Os resultados são mostrados na FIGURA 29.

FIGURA 29 - Variação do tempo de banho ultrassônico (pH 7). Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,0)/ACN (75:25 V/V) vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$. $E = 1,4 \text{ V}$ x Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$).

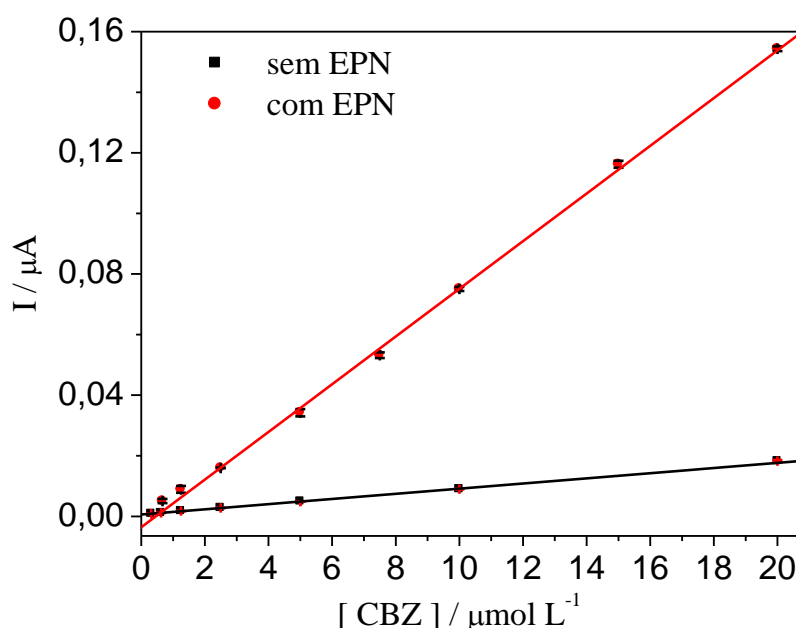


Como observado na FIGURA 28, o tempo de banho ultrassônico que apresentou o melhor sinal analítico foi o de 15 min. Foi observado visivelmente que para a amostra cujo tempo de ultrassom foi de 3 min, houve pouca turvação, o que revela que para esta amostra a formação de micelas foi menos favorecida em comparação às demais. Isto pode ser atribuído ao fato de que a amostra pode não ter atingido a temperatura de ponto nuvem enquanto estava no banho ultrassônico devido ao pequeno tempo de contato. Uma vez encontrada a melhor condição para realização da EPN, foi dado continuidade ao processo de validação do método proposto.

4.6-CURVA DE CALIBRAÇÃO COM E SEM EPN: DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO

Para verificação da eficiência da EPN, o fator de pré-concentração (F_C) foi calculado (Seção 1.2.2) a partir da construção de uma curva analítica obtida com CBZ na faixa de $0,67 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ submetida ao procedimento de extração e pré-concentração por ponto nuvem, e outra compreendendo a faixa de $0,3125 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ obtida sem o procedimento de extração e pré-concentração. A FIGURA 30 mostra as curvas analíticas obtidas sem e com o procedimento EPN;

FIGURA 30 - Curva analítica obtida com e sem o procedimento de EPN. Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,4 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$.



De acordo com as curvas analíticas obtidas para a determinação do CBZ, com e sem a EPN, mostradas na FIGURA 30, pode-se observar que as curvas apresentam excelente linearidade na faixa estudada, com coeficientes de correlação iguais a 0,999 nos intervalos de concentração investigados. As equações de reta obtidas pela regressão linear do conjunto de pontos mostrados na FIGURA 30 estão mostradas abaixo:

$$I/\mu\text{A} = -0,00212 \mu\text{A} + 0,00778 \mu\text{A} / \mu\text{mol L}^{-1} [\text{CBZ}] / \mu\text{mol L}^{-1} \quad (\text{com EPN})$$

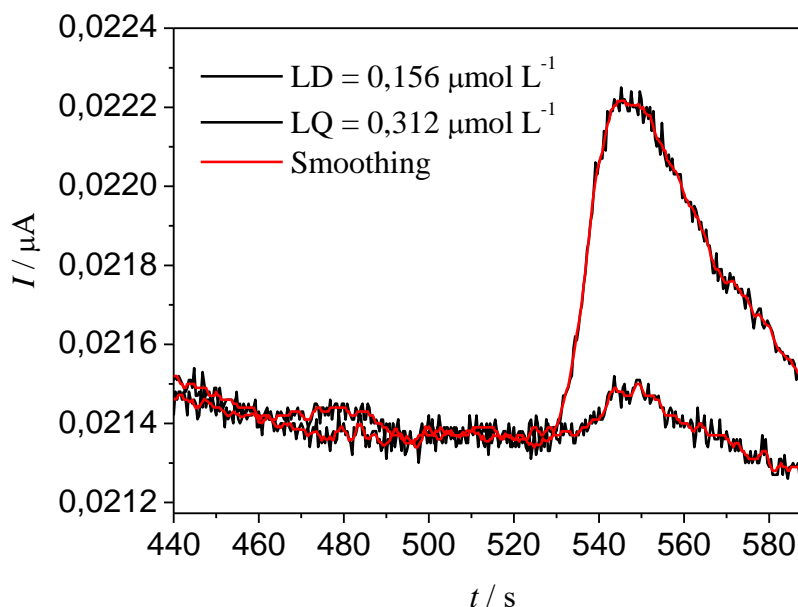
$$I/\mu\text{A} = 0,000611 \mu\text{A} + 0,000853 \mu\text{A} / \mu\text{mol L}^{-1} [\text{CBZ}] / \mu\text{mol L}^{-1} \quad (\text{sem EPN})$$

Os valores dos coeficientes angulares das curvas analíticas sem e com o procedimento de extração e pré-concentração por ponto nuvem ($8,53 \times 10^{-4} \mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$ e $7,78 \times 10^{-3} \mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente) permitiram determinar o fator de pré-concentração da extração, o qual foi de 9,12.

Até onde foi possível verificar, não há na literatura trabalhos que descrevem EPN do CBZ em frutas. Em trabalho desenvolvido por nosso grupo, já citado (CAIXETA-NETA *et al.*, 2020), o fungicida Tiabendazol, também pertencente a classe dos benzimidazois, foi extraído e pré-concentrado de amostras de tomate e obteve $F_C = 5,7$. No trabalho descrito por HALKO *et al.* (2004), o CBZ foi extraído de amostras de água desionizada enriquecidas com solução padrão de CBZ. Para isso, usaram a mistura dos surfactantes não iônicos Genapol X-080 e o POLE, e obtiveram $F_C = 10$. Considerando a complexidade da matriz morango, e que o processo de EPN desenvolvido permite pré-concentrar as amostras em um pouco mais de 9 vezes, o que representa um ótimo resultado pois os objetivos de pré-concentrar a amostra foi atingido.

O limite de detecção (LD) foi obtido considerando a concentração correspondente ao sinal de detecção como sendo, no mínimo, três vezes maior que o sinal do ruído. Já o limite de quantificação (LQ) foi definido como sendo a menor concentração da espécie analítica cujo sinal analítico pode ser quantificado com reprodutibilidade de pelo menos 75%. As concentrações resultantes das adições do fungicida na obtenção do LD e do LQ (sem o procedimento de EPN) foram de $0,156 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,312 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, conforme mostra a FIGURA 31.

FIGURA 31 - Cronoamperogramas do CBZ sem o procedimento de EPN. Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,4 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$.



Uma vez determinado o valor de F_C para o CBZ, os valores dos limites de detecção e quantificação nas amostras de morango foram convertidos usando-se a Equação 2 (Seção 3.5). Neste caso, define-se C_{ob} como sendo os LD ou LQ com processo de EPN, C_C como sendo os LD ou LQ obtidos sem processo de extração (Seção 4.4) e o F_C como sendo igual a 9,12. Assim, os valores dos limites de detecção e quantificação do CBZ em amostras de morangos convertidos foram de $6,54 \mu\text{g L}^{-1}$ (ou $0,0342 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $13,1 \mu\text{g L}^{-1}$ (ou $0,0684 \mu\text{mol L}^{-1}$), respectivamente.

Uma comparação entre os LD obtidos, com aqueles encontrados na literatura (TABELA 5), mostrou que os LD apresentados neste trabalho estão abaixo da maioria dos valores descritos. Vale ressaltar que, até onde foi possível verificar, este trabalho é o único que realmente fortifica a polpa da matriz morango, sem qualquer diluição prévia da matriz ao método de extração. Fato este que justifica a não detecção na amostra do branco desses trabalhos, apesar dos baixos limites de detecção relatados.

TABELA 5 - Limites de detecção e quantificação da literatura para CBZ em variadas matrizes e utilizando diferentes métodos de extração e análise.

<i>Amostra</i>	<i>Método de extração</i>	<i>Material de eletrodo</i>	<i>Método analítico</i>	<i>LD</i>	<i>LQ</i>	<i>Referência</i>
Eletrólito fortificado	-	grafeno (screen-printing)	SWV	0,11 mg L ⁻¹	0,38 mg L ⁻¹	NOYROD <i>et al.</i> , 2014
Suco de laranja diluído	-	SiO ₂ /MWCNT/GCE	SWV	0,143 μmol L ⁻¹ (27 ppb)	0,476 μmol L ⁻¹ (91 ppb)	RAZZINO <i>et al.</i> , 2015
Amostra de rio fortificada	-	MWCNT/GCE	CV	55 nmol L ⁻¹ (10,5 ppb)	0,256 μmol L ⁻¹	RIBEIRO <i>et al.</i> , 2011
Eletrólito fortificado	-	DDB	SWV	1,6 μmol L ⁻¹	5,5 μmol L ⁻¹	LIMA <i>et al.</i> , 2016
Amostra de rio fortificada	-	DDB	SWV	0,12 μmol L ⁻¹ (22 ppb)	0,40 μmol L ⁻¹ (75ppb)	FRANÇA <i>et al.</i> , 2012
Pera	QuEChER Se extração em fase sólida dispersiva (d-SPE).	-	LC-MS/MS	-	0,02 mg kg ⁻¹	LEE <i>et al.</i> , 2018
Eletrólito fortificado	-	ZnFe ₂ O ₄ /SWCNT/GCE	SWV	0,09 μmol L ⁻¹	0,50 μmol L ⁻¹	DONG <i>et al.</i> , 2017
Suco de frutas fortificadas	-	ZMCPE	SWV	0,51 μg L ⁻¹	1,67 μg L ⁻¹	MAXIMIANO, <i>et al.</i> , 2019
Polpa de morango	EPN	DDB	HPLC-EC	6,54 μg L ⁻¹ (0,0342 μmol L ⁻¹)	13,1 μg L ⁻¹ (0,0684 μmol L ⁻¹)	Este trabalho

4.7 – ESTUDO DE RECUPERAÇÃO: DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO E DA EXATIDÃO DO MÉTODO

A precisão e a exatidão do método foram determinadas a partir de ensaios de recuperação. Para que o método seja considerado preciso, os valores dos coeficientes de

variação (CV%) podem ser de até 15% (OLIVEIRA, 2012). A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de um determinado analito que pode ser recuperado em um processo de extração em relação à quantidade real presente na amostra. Além disso, em estudos de recuperação podem ser feitos testes de significância, utilizando o teste de *t-Student* mostrado na Equação 6 (OLIVEIRA, 2012).

$$t = [(R\%_m - 100) / DP_{rec}] / n^{1/2} \quad \text{Equação 6}$$

onde, *t* é o valor do teste de *Student*, $R\%_{\text{m\u00e9dio}}$ 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 ($t_{\text{cr\u00edtico}}$), para (*n* - 1) graus de liberdade em um dado n\u00edvel de signific\u00e2ncia, o m\u00e9todo \u00e9 considerado exato, ou seja, n\u00e3o h\u00e1 diferen\u00e7as significativas entre a porcentagem de recupera\u00e7\u00e3o obtida e o valor desej\u00e1vel (100%).

Dessa forma, a precis\u00e3o das medidas foi avaliada como coeficiente de varia\u00e7\u00e3o percentual (CV%), sendo as an\u00e1lises realizadas em quintuplicada (*n* = 5) e executadas sequencialmente no mesmo dia (precis\u00e3o intra-dia) e em tr\u00eas dias diferentes (precis\u00e3o inter-dia). A exatid\u00e3o foi avaliada segundo o desvio padr\u00e3o das medidas (DP) e o teste de Student foi aplicado utilizando-se as porcentagens de recupera\u00e7\u00e3o do CBZ em tr\u00eas n\u00edveis de concentra\u00e7\u00e3o (2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) adicionadas em amostras de morangos isentas de qualquer agrot\u00f3xico, cultivados de modo org\u00e2nico.

TABELA 6 - Efici\u00eancias de recupera\u00e7\u00e3o percentuais (*n* = 5), coeficientes de varia\u00e7\u00e3o e *t* obtidos na determina\u00e7\u00e3o do CBZ em morango em 3 n\u00edveis de concentra\u00e7\u00e3o. Eletr\u00f3lito suporte: fase m\u00f3vel de KH_2PO_4 (0,01 mol L^{-1} ; pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) vaz\u00e3o de 0,8 mL min^{-1} . *E* = 1,4 V x Ag/AgCl (3,0 mol L^{-1}) e pH de extra\u00e7\u00e3o = 7,0. Eletrodo de DDB pr\u00e9-tratado catodicamente (ET) e a\u00e7o inoxid\u00e1vel (CE). Volume de inje\u00e7\u00e3o = 20 μL .

	1\u00b0 dia			2\u00b0 dia			3\u00b0 dia			Exatid\u00e3o e precis\u00e3o inter-dia		
	Cad ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	R% _{m\u00e9dio} $\pm DP_{rec}$	CV (%)	t	R% _{m\u00e9dio} $\pm DP_{rec}$	CV (%)	t	R% _{m\u00e9dio} $\pm DP_{rec}$	CV (%)	t	R% _{m\u00e9dio} $\pm DP_{rec}$	CV (%)
CBZ	2,0	93,2 \pm 2	2,15	-1,52	103 \pm 7	6,79	0,19	89,2 \pm 9	10,0	-0,54	95,1 \pm 7	7,36
	5,0	94,2 \pm 3	3,05	-0,86	88,1 \pm 3	3,20	-1,77	94,5 \pm 2	2,59	-1,23	92,3 \pm 4	3,90
	10,0	83,8 \pm 3	3,54	-2,42	78,1 \pm 9	11,3	-1,09	79,4 \pm 4	4,90	-2,30	80,4 \pm 3	3,69

De acordo dos dados apresentados na TABELA 6, as recupera\u00e7\u00f5es m\u00e9dias dos tr\u00eas dias variaram entre 78,1% e 103%. Para as 3 concentra\u00e7\u00f5es nominais, os valores dos

coeficientes de variação calculados foram todos menores do que 15%. Esses resultados indicam que o método pode ser considerado preciso.

Com relação ao teste de *Student*, com 95% de confiança e $(n - 1)$ graus de liberdade, os valores de t calculados apresentaram valores menores que o valor crítico tabelado ($t_{95\%} = 2,78$), para todos os níveis de concentração e nos três dias investigados. Portanto, o método desenvolvido pode ser considerado preciso, com boa repetitividade e reprodutibilidade.

4.8 – ESTUDO DE INTERFERENTE

O método proposto foi avaliado quanto à presença de um agrotóxico como interferente, o clorpirifós (CPF) em amostras de morango comercial. O CPF é um inseticida organofosforado, que ocupa o terceiro lugar entre os agrotóxicos não autorizados detectados em concentrações iguais ou superiores a 0,01 mg/kg nas amostras monitoradas de morango entre 2013 e 2015.

Como já mencionado, o CPF foi o agrotóxico que apresentou o segundo maior índice de detecções irregulares, ou seja, não autorizado para o cultivo ou acima do limite máximo de resíduo (LMR) do total de alimentos investigados, tanto no período de 2013 a 2015 quanto no período de 2017 a 2018. Este último representa o primeiro ciclo do plano plurianual de 2017 a 2020. As amostras de morango, segundo esse plano, serão analisadas no ciclo de amostragem de 2020, sendo seus resultados ainda não apresentados até o momento.

A FIGURA 32 mostra os cronoamperogramas obtidos para amostra de morango comercial sem adição de qualquer fungicida (branco), com adição de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CBZ, somente com adição de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CPF, com a adição de CBZ e CPF na mesma concentração e, por último, com a adição de CPF em concentração dez vezes maior que a do CBZ.

Os cronoamperogramas demonstram que o CPF, além de não apresentar sinal eletroquímico, não interfere de forma competitiva no processo de extração por ponto nuvem, em nenhum dos experimentos realizados. As concentrações obtidas (C_{ob}), assim como eficiências de recuperação percentual (R%) do CBZ foram determinadas e são apresentados na TABELA 7. Além disso, nas amostras de morango comercial sobre as quais não foram adicionados CBZ também foram detectados sua presença acima do limite de quantificação do método proposto, o que possibilitou sua quantificação nessas amostras.

FIGURA 32 - Cronoamperogramas referente à EPN (condição otimizada), em morango comercial, na presença e ausência do interferente CPF. **(a)** - branco comercial; **(b)** - CBZ $5 \mu\text{mol L}^{-1}$; **(c)** - CPF $5 \mu\text{mol L}^{-1}$; **(d)** - CBZ $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ + CPF $5 \mu\text{mol L}^{-1}$; **(e)** - CBZ $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ + CPF $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,4 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$

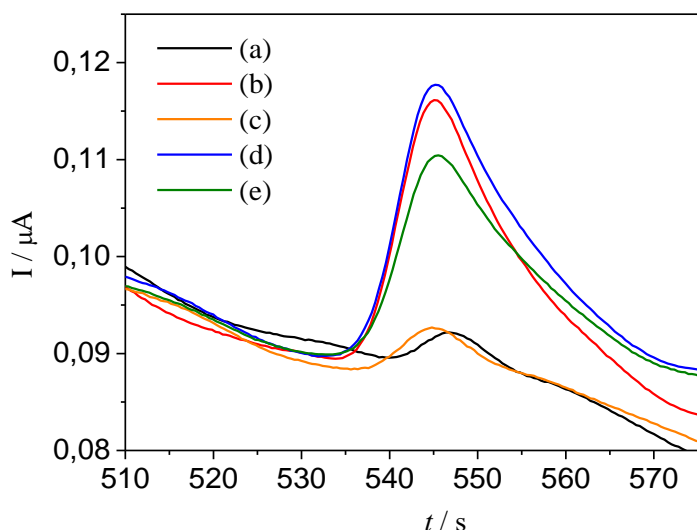


TABELA 7 – Concentrações médias obtidas (C_{ob}) e eficiências de recuperação percentual ($R\%_{\text{média}}$) do CBZ ($n = 3$), em morango comercial, na presença e ausência do interferente CPF. Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,4 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$.

Amostra*	$I_{\text{média}}$ (μA)	C_{ob} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	$R\%_{\text{média}}$
(a)	0,003410	0,72	--
(b)	0,02661	5,96	119
(c)	0,003380	0,712	--
(d)	0,02741	6,17	123
(e)	0,02619	5,86	117

***(a)** - branco comercial; **(b)** [CBZ] = $5 \mu\text{mol L}^{-1}$; **(c)** [CPF] = $5 \mu\text{mol L}^{-1}$; **(d)** [CBZ] = $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ + [CPF] = $5 \mu\text{mol L}^{-1}$; **(e)** [CBZ] = $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ + [CPF] = $50 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Essas medidas confirmam que não houve interferência do CPF no método proposto, sendo que a média de recuperação percentual obteve um CV% de 3%. As porcentagens de recuperação médias apresentam valores significativos acima de 100%. Isso ocorreu porque na amostra de morango comercial foi detectada a presença de CBZ, tal como

comprovado previamente na FIGURA 32. As concentrações de CBZ em mg por cada 1 kg de morango, encontradas nas amostras de morango comercial (a) e (c) que não foram fortificadas com o CBZ foram respectivamente $0,137 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,136 \text{ mg kg}^{-1}$, o que deixa evidente que a presença do CPF não interfere na extração por ponto nuvem, mesmo em concentrações baixas do CBZ. O LMR segundo Relatório Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) 2013-2015, do CBZ em amostras de morango é de $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de morango. Portanto, embora detectados na amostra, os valores encontrados apontam que a amostra está em situação regular em relação a este fungicida.

4.9– APLICAÇÃO DO MÉTODO

4.9.1 – AMOSTRAS COMERCIAIS

Após a validação do método, o método foi aplicado para a análise de amostras comerciais de morango de três estabelecimentos localizados na cidade de Catalão-GO. As amostras foram obtidas de fornecedores locais distintos e denominadas de Comercial I, II e III. As FIGURAS 33, 34 e 35 mostram os resultados obtidos para cada amostra de morango comercial, respectivamente.

FIGURA 33 - (a) Cronoamperogramas da EPN: (—) morango orgânico; (—) morango Comercial I; (—) morango Comercial I + CBZ ($C_{ad} = 5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,4 \text{ V}$ x Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \text{ } \mu\text{L}$. (b) Região ampliada do sinal analítico do CBZ.

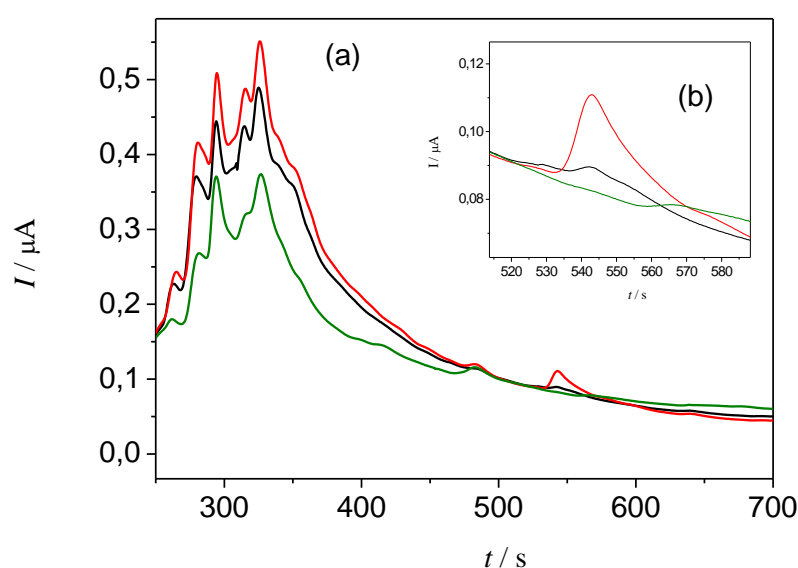


FIGURA 34 - (a) Cronoamperogramas da EPN: (—) morango orgânico; (—) morango Comercial II; (—) morango Comercial II + CBZ ($C_{ad} = 5 \mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,4 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$. (b) Região ampliada do sinal analítico do CBZ.

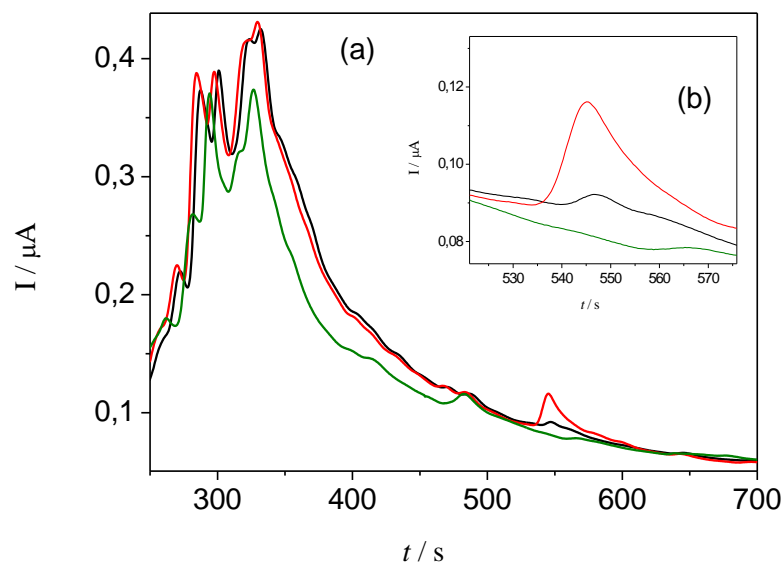
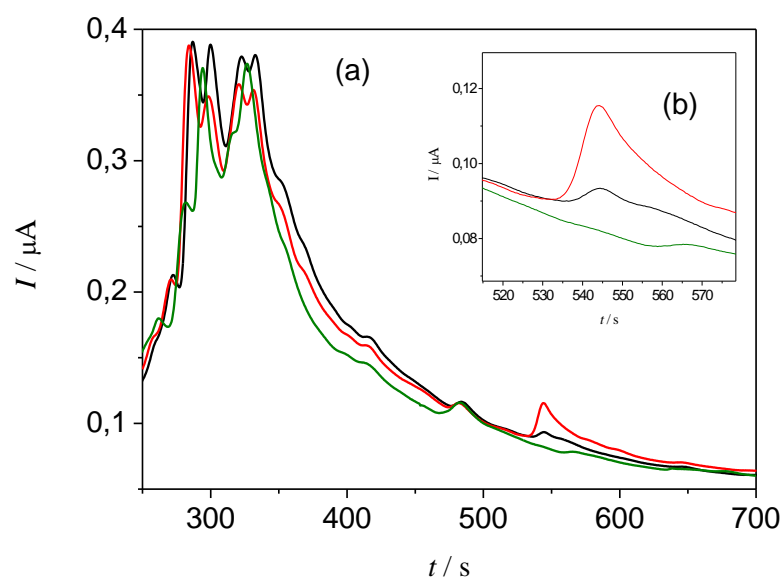


FIGURA 35 - (a) Cronoamperogramas da EPN: (—) morango orgânico; (—) morango Comercial III; (—) morango Comercial III + CBZ ($C_{ad} = 5 \mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,4 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$. (b) Região ampliada do sinal analítico do CBZ.



Ao observar as FIGURAS 33 a 35 verifica-se que em todas as amostras de morango comercial há presença do fungicida CBZ, mesmo nas amostras que não foram

fortificadas. Utilizando-se a Equação 2 (Seção 3.5), foi possível determinar a concentração presente nessas amostras, além de verificar a $R\%_{\text{média}}$ para as amostras comerciais fortificadas com CBZ ($C_{\text{ad}} = 5 \mu\text{mol L}^{-1}$). Esses resultados encontram-se apresentados na TABELA 8. A quantificação do CBZ presente nas amostras é válida, pois as concentrações encontradas estava acima do LQ da metodologia desenvolvida.

TABELA 8 – Concentrações médias obtidas (C_{ob}), e eficiências de recuperação percentual ($R\%_{\text{média}}$) do CBZ ($n = 3$), nas amostras de morango Comercial I, II e III. Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,4 \text{ V}$ x Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$.

Amostra	$I_{\text{média}}$ (nA)	C_{ob} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	$R\%_{\text{média}}$	C_{ob} (mg / kg de morango)
Comercial I	1,2	0,151	--	0,0289
Comercial I _{fortificado}	22,86	5,72	114	--
Comercial II	2,72	0,542	--	0,104
Comercial II _{fortificado}	26,66	6,68	134	--
Comercial III	3,59	0,767	--	0,145
Comercial III _{fortificado}	24,96	6,26	125	--

É importante ressaltar que a presença de CBZ em amostras de morangos é considerada regular, se a concentração encontrada for de até $0,5 \text{ mg/kg}$ de morango (ANVISA, 2016). Desta maneira, todas as amostras comerciais analisadas estão regulares para a presença do CBZ.

No último Relatório divulgado do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) 2017-2018, que representa o primeiro ciclo do plano plurianual 2017 a 2020, as amostras de morango não foram analisadas. Isso ocorreu porque em 2016 houve uma reestruturação do PARA, com o intuito de implementar melhorias que visaram fortalecer a expressividade do Programa e assegurar a sua continuidade. O número de alimentos monitorados foi ampliado de 25 para 36, em três ciclos de coleta. Para isso, seguiram-se critérios de maior consumo *per capita* e do consumo total de alimentos de origem vegetal pela população brasileira, considerando-se os dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009, realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (ANVISA, 2019).

Dessa forma, alimentos de maior consumo e com maior índice de situação de potencial risco, de acordo com o histórico do PARA, se tornaram prioritários. O cronograma de amostragem anual é proposto pela ANVISA e aprovado previamente pelos representantes

estaduais do Programa. O morango será analisado no último ciclo de amostragem, previsto para ocorrer em 2020.

Cabe ressaltar ainda que, de acordo com o último relatório do PARA, o CBZ foi selecionado para a próxima reavaliação, devido à preocupação em relação a mutagenicidade, toxicidade para o desenvolvimento e toxicidade reprodutiva. Além disso, esse ingrediente ativo foi o mais detectado no PARA entre 2013 e 2015, sendo caracterizado de risco agudo para o consumo de alimentos monitorados, e ficou entre os mais detectados entre 2017 e 2018, como mencionado anteriormente.

4.9.2 – TESTE DE LAVAGEM DE AMOSTRA COMERCIAL DE MORANGO CONTAMINADAS POR CBZ

A segurança alimentar é um tema relevante e amplamente discutido. Lavar e sanitizar produtos horte-frutíferos para impedir doenças, transmitidas por agentes que penetram no organismo humano, através da ingestão de alimentos contaminados é importante e necessário. Os agentes podem ser químicos, metais tóxicos ou biológicos. Os métodos de lavagem geralmente envolvem o uso de água, para remover sujidades, tratamento mecânico com utilização de escovas, seguido de enxágue, sendo que nessa etapa pode ser incluído uma aplicação de sanitizante (BATZER *et al.*, 2002).

Entretanto, estudos da eficácia desses processos para remoção dos resíduos de pesticidas normalmente não são realizadas. Em geral, os estudos avaliam a eficácia desses processos em relação a destruição dos microrganismos patogênicos (agentes biológicos), enquanto as respostas sobre a remoção dos resíduos de pesticidas não são conclusivas. Dessa forma se faz necessário a aplicação dos métodos desenvolvidos na detecção de pesticidas, também em estudos de lavagem desses alimentos, para assim comprovar a eficácia das maneiras de lavagem já utilizadas e comprovadas para a remoção de agentes biológicos (ZHANG *et al.*, 2007).

Assim, 100 g de amostras de morango comercial foram borrifadas com 5 mL de solução metanólica de CBZ (2 mmol L⁻¹), obtendo-se uma concentração nominal de 20 mg/kg, tal como descrito na Seção 3.8.2. Os resultados são mostrados na TABELA 9.

TABELA 9 - Concentrações médias obtidas (C_{ob}), assim como remoção percentual após ação de lavagem ($L\%_{média}$) do CBZ ($n = 3$). (a) água; (b) detergente comercial 1% (v/v); (c) bicarbonato de sódio 0,1% (p/v); (d) água sanitária 1% (v/v) de cloro ativo e (e) amostra não lavada. Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 (0,01 mol L^{-1} ; pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) vazão de 0,8 mL min^{-1} . $E = 1,4$ V x Ag/AgCl (3,0 mol L^{-1}). Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = 20 μ L.

LAVAGEM	$I_{média}$ (nA)	C_{ob} (μ mol L^{-1})	C_{ob} (mg/kg de morango)	$L\%_{média}$
(a)	12,2	2,98	0,57	60,1
(b)	10,2	2,46	0,47	67,1
(c)	8,79	2,10	0,40	71,9
(d)	8,83	2,11	0,40	71,7
(e)	29,7	7,48	1,43	0,00

Após o tratamento estatístico, foi observado na TABELA 9 que a remoção do CBZ pelas diferentes lavagens ocorreu de maneira satisfatória e em diferentes níveis. A remoção percentual após ação de lavagem ($L\%_{média}$) foi calculada tendo-se como base a C_{ob} do morango sem nenhum tipo de lavagem. É importante ressaltar que a C_{ob} do morango sem nenhum processo de lavagem encontra-se em um valor acima (quase o triplo) do LMR estabelecido no Relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) 2013-2015. Assim, os meios de lavagem que apresentaram maior eficiência foram com bicarbonato de sódio 0,1% (m/v) e água sanitária 1% (V/V) – processos (c) e (d), respectivamente, seguido pela lavagem com detergente comercial 1% (V/V) – processo (b). Todos estes processos de lavagem citados permitem o consumo do morango abaixo do LMR de 0,5 mg/kg. Por outro lado, a lavagem feita apenas com água – processo (a), não foi suficiente. Ressalta-se também que, nesse estudo, não foi feita distinção entre a poupa da fruta e a casca, não tendo sido avaliada a penetração do CBZ na fruta, tendo em vista que o morango é uma fruta onde não se tem o costume de descascar previamente ao consumo.

4.10 –SISTEMA BIA-SWV

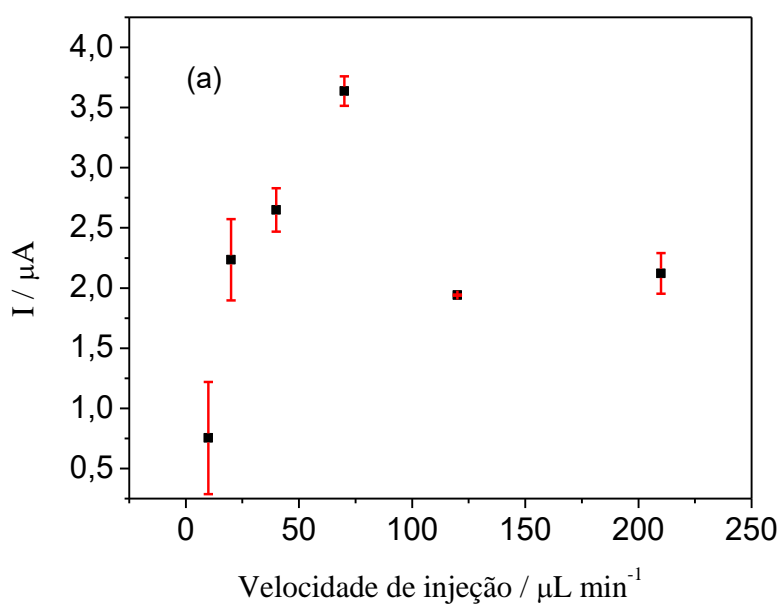
Como já mencionado, o eletrodo de DDB apresentou bons resultados com as soluções padrão de CBZ em pH 10 (Seção 4.2). As melhores condições SWV previamente descritas e discutidas foram usadas no sistema BIA. O sistema BIA vem sendo descrito na literatura como uma técnica promissora para a detecção de compostos orgânicos em matrizes reais e pode ser utilizada como técnica alternativa ao HPLC-EC, desde que seja possível separar ou minimizar os efeitos dos interferentes da amostra.

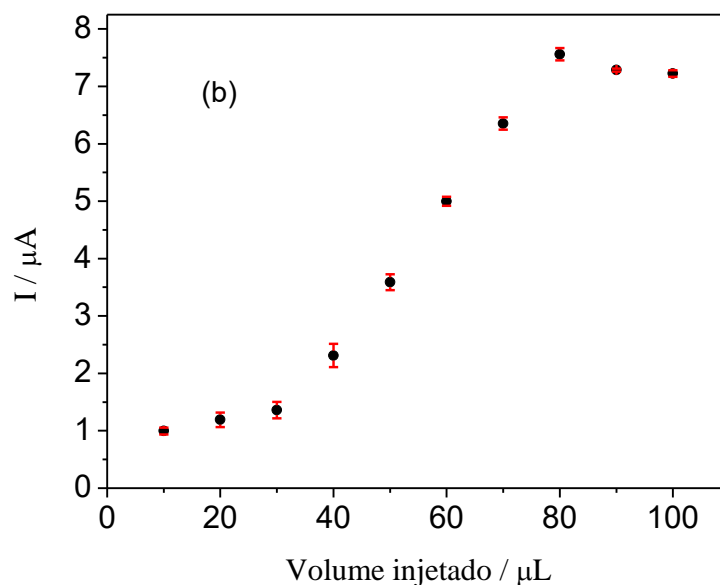
Os parâmetros do sistema BIA (velocidade e volume de injeção) foram avaliados para seleção das melhores condições de trabalho. A velocidade de injeção foi

variada entre $10 \mu\text{L s}^{-1}$ e $210 \mu\text{L s}^{-1}$, sendo esses valores fixados e programáveis no sistema da micropipeta eletrônica. Posteriormente, o volume de injeção foi variado entre $20 \mu\text{L}$ e $100 \mu\text{L}$. As FIGURAS 36 (a) e 36 (b) mostram os resultados das variações da velocidade de injeção e volume de injeção, respectivamente.

Conforme pode ser observada na FIGURA 36 (a), a velocidade de injeção que obteve a maior corrente foi a de $70 \mu\text{L s}^{-1}$. Após este valor, houve a diminuição do sinal de corrente obtido. Isso ocorreu provavelmente porque com o aumento da velocidade, ocorreu também a diminuição do tempo de injeção, o que afeta a Etapa (B) da FIGURA 11, sendo esta prejudicada, não ocorrendo o acúmulo do analito na superfície do eletrodo de maneira adequada.

FIGURA 36 - (a) Variação da velocidade de injeção (Volume de injeção = $50 \mu\text{L}$) e (b) Variação do volume de injeção (Velocidade de injeção = $70 \mu\text{L s}^{-1}$). $[\text{CBZ}] = 1,00 \mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrólito: KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 10). Amplitude de 100 mV , escada de potencial de 8 mV ($v = 80 \text{ mV s}^{-1}$).





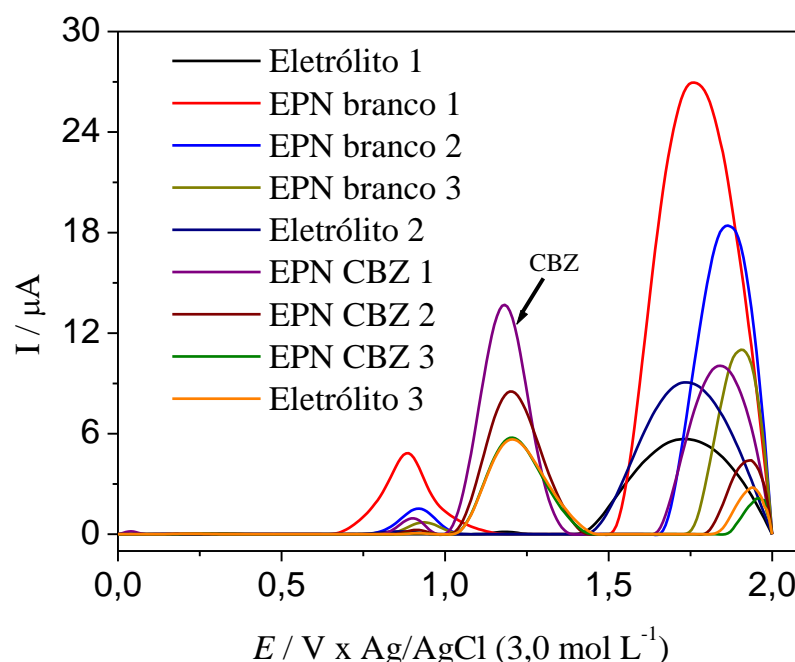
Após a otimização do parâmetro velocidade de injeção, o volume de injeção foi otimizado, FIGURA 36 (b) fixando-se a velocidade de injeção na melhor condição ($70 \mu\text{L s}^{-1}$) e variando-se o volume de injeção de $10 \mu\text{L}$ a $100 \mu\text{L}$. A medida que aumenta o volume injetado, há o aumento da corrente, obtendo o máximo em $80 \mu\text{L}$. Acima deste valor, um patamar é atingido. Não há mais aumento da corrente porque toda a área do eletrodo está sobre o acúmulo do analito, ou seja, uma porção da solução injetada pode não alcançar a superfície do eletrodo durante a realização da medida (OLIVEIRA, 2015).

Uma vez obtidas as melhores condições para o método BIA, as amostras provenientes da EPN fortificadas e não fortificadas (EPN branco) foram injetadas no sistema BIA. Para isso, foram realizadas injeções em triplicata, das fases ricas em surfactante das seguintes maneiras: i) sem nenhuma diluição; ii) com diluição pela metade com acetonitrila (mesma proporção usada no sistema HPLC-EC) e, iii) com diluição pela metade com o eletrólito suporte, mostradas respectivamente pelas FIGURAS 37, 38 e 39.

Segundo a literatura (Oliveira, 2015), o sistema BIA possibilita a injeção da amostra sem prévia diluição no eletrólito de suporte, já que a força iônica se mantém praticamente inalterada, devido ao pequeno volume injetado frente ao volume do eletrólito na célula do BIA. Além disso, pelo processo difusional, assim que a amostra termina de ser injetada ocorre a sua diluição para o seio da solução, o que possibilita a análise sequencial de sucessivas injeções sem a necessidade da troca do eletrólito. Assim, com o intuito de favorecer o processo difusional, e garantir a limpeza da superfície do eletrodo, foi aplicado

um potencial de limpeza de 2,0 V por 1 min, seguido novamente por agitação, antes do início de cada medida. As injeções foram feitas sequencialmente na ordem que é descrita na legenda de cores inserida na FIGURA 37. As linhas descritas como eletrólito foram obtidas pela varredura do eletrólito, com o intuito de verificar se o procedimento de limpeza estava sendo eficiente.

FIGURA 37 - Injeções das fases ricas em surfactante sem nenhuma diluição no sistema BIA-SWV. Condições otimizadas da EPN em morango orgânico não fortificado e fortificado (C_{ad} de CBZ = $10 \mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrólito: KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 10). Amplitude de 100 mV, escada de potencial de 8 mV ($v = 80 \text{ mV s}^{-1}$). Volume de injeção = $80 \mu\text{L}$; Velocidade de injeção = $70 \mu\text{L s}^{-1}$.



Entretanto, conforme pode ser observado na FIGURA 37, não foi possível obter repetitividade adequada das medidas realizadas em triplicada, provavelmente devido a maior viscosidade do surfactante a qual parece prejudicar o transporte difusional do analito em direção à superfície do eletrodo. Além disso, foi possível verificar que, após as medidas de injeção da fase rica em surfactante sem diluição prévia, a coloração da superfície do eletrodo de DDB ficou visivelmente alterada e com um aspecto de adsorção de material sobre a superfície. Nesse sentido, a adsorção observada, seja de algum subproduto ou mesmo do próprio surfactante, deve diminuir a área superficial útil do eletrodo de DDB diminuindo, portanto, sua sensibilidade em relação à detecção da amostra.

É sabido que os surfactantes podem ser adsorvidos em uma superfície hidrofóbica para formar um filme surfactante, o que pode alterar o sobrepotencial do analito na superfície do eletrodo e facilitar a taxa de transferência de elétrons (NEZAMZADEH-EJHIEH & BADRI, 2011). Dessa forma, esperava-se que a presença do surfactante melhorasse a resposta eletroquímica do analito. Infelizmente o que ocorre é que o excesso de surfactante pode atrapalhar essa resposta. Com o intuito de diminuir a viscosidade da fase rica em surfactante, proveniente das EPN das amostras de morango orgânico fortificadas e não fortificadas, essas amostras foram diluídas pela metade (1:1) em acetonitrila e no eletrólito (FIGURA 38 e 39 respectivamente).

FIGURA 38 - Injeções das fases ricas em surfactante diluídas em acetonitrila (1:1) no sistema BIA- SWV. Condições otimizadas da EPN em morango orgânico não fortificado e fortificado (C_{ad} de CBZ = $10 \mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrólito KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 10). Amplitude de 100 mV, escada de potencial de 8 mV ($v = 80 \text{ mV s}^{-1}$). Volume de injeção = $80 \mu\text{L}$; Velocidade de injeção = $70 \mu\text{L s}^{-1}$.

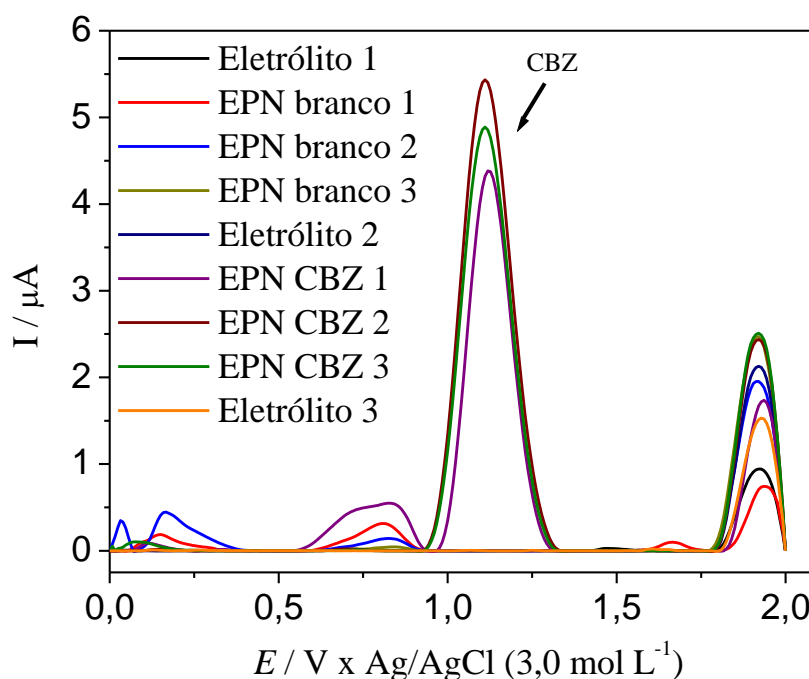
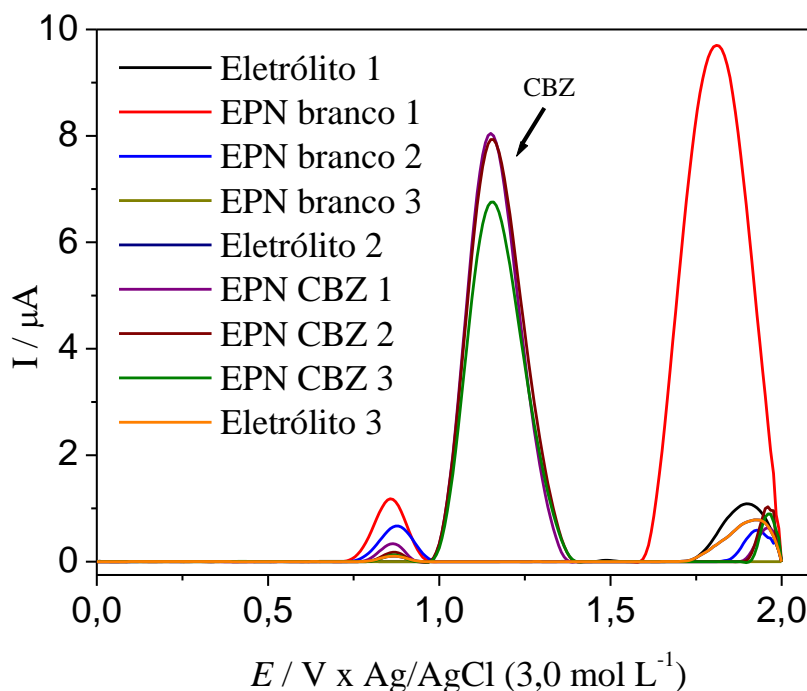


FIGURA 39 - Injeções das fases ricas em surfactante diluídas em eletrólito (KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 10) (1:1) no sistema BIA- SWV. Condições otimizadas da EPN em morango orgânico não fortificado e fortificado (C_{ad} de CBZ = $10 \mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrólito KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 10). Amplitude = 100 mV, escada de potencial de 8 mV ($v = 80 \text{ mV s}^{-1}$). Volume de injeção = $80 \mu\text{L}$; Velocidade de injeção = $70 \mu\text{L s}^{-1}$.



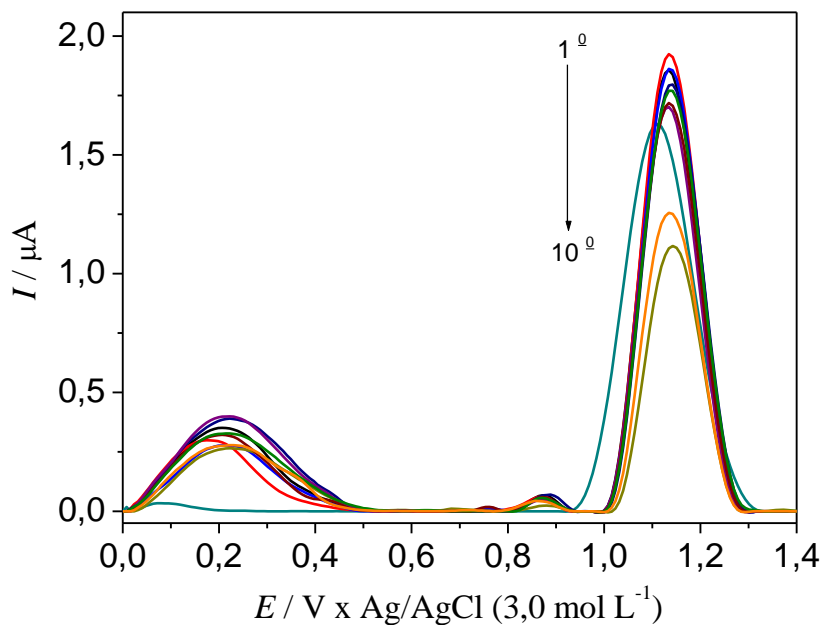
Ao observar as triplicatas das amostras fortificadas (EPN CBZ 1, 2, 3) e não fortificadas (EPN branco 1, 2 e 3) mostradas nas FIGURAS 37 a 39 fica visível que para as amostras onde não foram feitas diluições (FIGURA 37) a perda de sensibilidade é maior ao comparar com as amostras que foram diluídas (FIGURAS 38 e 39), o que resulta em um maior coeficiente de variação (CV%). A TABELA 10 sumariza os resultados encontrados em relação a variação de sinal das amostras fortificadas com CBZ, provenientes de EPN e injetadas no sistema BIA segundo as condições i, ii e iii previamente descritas, cujos resultados encontram-se mostrados nas FIGURAS 37, 38 e 39, respectivamente.

TABELA 10 – Correntes de pico anódica das amostras fortificadas com CBZ, provenientes de EPN e injetadas no sistema BIA- SWV e os respectivos CV% obtidos. Condições otimizadas da EPN em morango orgânico fortificado (C_{ad} de CBZ = $10 \mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrólito: KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 10). Amplitude = 100 mV, escada de potencial de 8 mV ($v = 80 \text{ mV s}^{-1}$). Volume de injeção = $80 \mu\text{L}$; Velocidade de injeção = $70 \mu\text{L s}^{-1}$.

Amostra	I_1 (μA)	I_2 (μA)	I_3 (μA)	$I_{\text{média}}$ (μA)	CV (%)
Sem diluição	13,8	8,50	5,74	9,34	43,8
Diluída em ACN	4,39	5,43	4,90	4,90	10,5
Diluída em eletrólito	8,10	7,92	6,76	7,59	9,56

De acordo com os resultados mostrados na TABELA 10, fica evidente que apesar do maior sinal de corrente em triplicata ($I_{\text{média}}$) ter sido obtido sem qualquer diluição, o coeficiente de variação ultrapassa muito o valor máximo aceitável de 15%, o que inviabiliza sua utilização. Com relação às amostras que foram diluídas em ACN e no eletrólito, ambas possuem valores de CV% dentro do limite aceitável. A $I_{\text{média}}$ obtida para a amostra diluída em eletrólito, apresentou valor apenas 19% menor em relação a amostra não diluída, o que evidencia que os efeitos de adsorção do surfactante podem ser mais efetivamente minimizados pela diluição das amostras em eletrólito do que em ACN. A FIGURA 40 mostra as voltametrias obtidas para o teste de repetitividade de uma mesma amostra proveniente de EPN (sob condições otimizadas) em morango orgânico fortificadas com CBZ (C_{ad} de CBZ = $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$), fase rica em surfactante diluídas em eletrólito (KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 10) (1:1), e injetada no sistema BIA- SWV.

FIGURA 40 - Teste de repetitividade ($n = 10$) para a técnica de BIA- SWV. Condições otimizadas da EPN em morango orgânico fortificado (C_{ad} de CBZ = $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$). Injeções das fases ricas em surfactante diluídas em eletrólito (KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 10) (1:1). Eletrólito: KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 10). Amplitude = 100 mV , escada de potencial de 8 mV ($v = 80 \text{ mV s}^{-1}$. Volume de injeção = $80 \mu\text{L}$; Velocidade de injeção = $70 \mu\text{L s}^{-1}$).



De acordo com os resultados mostrados na FIGURA 40, para 10 medidas, obteve-se um valor médio de corrente de pico de $1,616 \pm 0,3125 \mu\text{A}$ com um CV% de 19,3%. A falta de uma boa repetitividade (CV% > 15%) obtida e esperada no sistema BIA pode ser atribuída ao fato de que como o volume máximo aspirado pela micropipeta eletrônica era de $300 \mu\text{L}$, a cada três injeções de $80 \mu\text{L}$ foi necessário desacoplar a micropipeta eletrônica, da célula do sistema BIA. Nesse sentido, uma vez que a entrada de fixação da micropipeta eletrônica na célula BIA na qual não é totalmente rígida, a variação observada pode ter ocorrido devido à alguma mudança de posicionamento da ponteira da micropipeta, resultando em uma variação na direção de injeção da amostra em direção à superfície do eletrodo. O CV% acima de 15% também poderia ser atribuído a limitações do sistema no qual a partir de certo número de injeções o eletrodo não responde de forma adequada.

Ademais, observou-se a formação de bolhas e espuma devido a presença do surfactante e a agitação. Dessa forma, a cada duas injeções o eletrólito precisou ser descartado. Sendo assim, as medidas se tornaram dispendiosas, demandando maior tempo e grande volume de eletrólito (80 mL de eletrólito foram descartados a cada troca). Assim, a rotina de análise acaba por se distanciar da proposta do sistema BIA, no qual sucessivas

injeções são feitas sem a necessidade de troca do eletrólito, o que confere à técnica a alta frequência analítica descrita na literatura. Apesar disto, o ganho em sinal analítico comparado com HPLC-EC, (para a C_{ad} de CBZ $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi quase cem vezes maior, mostrando que o método BIA pode ser bastante promissor desde que sejam assegurados meios que garantam a repetitividade adequada das medidas, seja por parte do eletrodo e/ou por parte do próprio sistema. Além disso, o tempo de análise é muito menor quando comparado com o sistema HPLC -EC.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÃO

No presente trabalho foi demonstrado a eficiência da Extração por Ponto Nuvem em amostras de morango para a extração e pré-concentração do fungicida carbendazim e sua determinação por HPLC-EC usando um eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) pré-tratado catodicamente.

As melhores condições obtidas para os parâmetros cromatográficos resultaram em uma composição de fase móvel de KH_2PO_4 (0,01 mol L⁻¹; pH 4,0) / ACN (75:25 V/V) e vazão de 0,8 mL min⁻¹. O voltamograma hidrodinâmico obtidos nas melhores condições cromatográficas permitiu fixar o potencial de 1,4 V x Ag/AgCl (3,00 mol L⁻¹) para ser aplicado na detecção eletroquímica do CBZ. A eficiência do processo de extração foi avaliada variando-se o pH das amostras de morango sendo o melhor resultado referente ao maior sinal de corrente do CBZ obtido em pH 7,0. As variáveis temperatura, tempo de banho ultrassônico, massa de NaCl e quantidade de surfactante foram investigadas por meio de Planejamento Fatorial 2⁴ e análise de composto central (CCD), sendo as melhores condições de 40 °C, 15 min, 0,6 g de NaCl e 1mL de 14% de Tergitol[®] (% V/V), respectivamente. Os valores de LD e LQ do CBZ em amostras de morangos, convertidos usando o F_C, foram de 6,54 µg L⁻¹ (0,0342 nmol L⁻¹) e 13,1 µg L⁻¹ (0,0684 nmol L⁻¹), respectivamente.

O método proposto foi aplicado em amostras de morango comercial de três estabelecimentos da cidade de Catalão-GO. Todas as amostras comerciais analisadas encontravam-se regulares quanto à presença do CBZ. Além disso, foi também testado o método de lavagem do morango, sendo o mais eficiente realizado pelo uso de bicarbonato de sódio 0,1% (m/v).

Foram também realizadas medidas como sistema BIA (*Batch Injection Analysis*). As melhores condições para o sistema BIA- SWV foram obtidas com eletrólito: KH_2PO_4 (0,01 mol L⁻¹; pH 10); Amplitude = 100 mV, escada de potencial de 8 mV ($v = 80$ mV s⁻¹). Volume de injeção = 80 µL; Velocidade de injeção = 70 µL s⁻¹ e injeções das fases ricas em surfactante diluídas em eletrólito (KH_2PO_4 0,01 mol L⁻¹; pH 10) (1:1). O ganho em sinal analítico comparado com HPLC-EC, (para a C_{ad} de CBZ 2,0 µmol L⁻¹) foi quase cem vezes maior, mostrando que o método BIA pode ser bastante promissor desde que sejam assegurados meios que garantam a repetitividade adequada das medidas.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, L. M.; BACKES, R. S.; GUEDES, T. J.; SANTOS, W. T. P.; SOUZA, J. B. G.; FERREIRA, V. S.; SILVA, R. A. B. Fast and Selective Simultaneous Determination of Acetaminophen, Aspirin and Caffeine in Pharmaceutical Products by Batch Injection Analysis with Multiple Pulse Amperometric Detection. *Electroanalysis*, v. 30, p. 296-303, **2018**.
- ALFARO, M. A. Q.; FERRO, S.; MARTÍNEZ-HUITLE, C. A. & VONG, Y. M. “Boron doped diamond electrode for the wastewater treatment”. *J. Braz. Chem. Soc.* 17: 227, **2006**.
- ANDRADE, L. S.; MORAES, M. C. de; ROCHA FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O.; CASS, Q. B. “A multidimensional high performance liquid chromatography method coupled with amperometric detection using a boron-doped diamond electrode for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk”. *Anal. Chim. Acta*, 654: 127-132, **2009**.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Monografias Autorizadas. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-torizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas> > Acesso em 01 de Junho de **2018**.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA): Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015. Brasília, DF. p. 31, **2016**.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA): Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2017 a 2018. Primeiro ciclo do plano plurianual 2017-2020. Brasília, DF. p. 40, **2019**.
- ASHRAFI, A. M.; ĐORĐEVIĆ, J.; GUZSVÁNY, V.; ŠVANCARA, I.; TRTIĆ-PETROVIĆ, T.; PURENOVIĆ, M. & VYTRÁS, K. “Trace determination of Carbendazim fungicide using adsorptive stripping voltammetry with a carbon paste electrode containing tricresyl phosphate”. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 7:9717 – 9731, **2012**.
- BACKES, R. S.; GUEDES, T. J.; DOS SANTOS, W. T. P.; DA SILVA, R. A. B. Determinação rápida e simples de citrato de sildenafila (Viagra® e genéricos) empregando eletrodo impresso de carbono em sistemas FIA e BIA com detecção amperométrica. *QUIMICA NOVA*, v. 40, p. 752, **2017**.
- BALLESTEROS-GÓMEZ, A.; SICILIA, M. D. & RUBIO, S. “Supramolecular solvents in the extraction of organic compounds. A review”. *Anal. Chim. Acta*, 677: 108-120, **2010**.
- BATZER, J. C.; GLEASON, M. L.; WELDON, B.; DIXON, P. M.; NUTTER, F. W. J. “Evaluation of postharvest removal of sooty blotch and flyspeck on apples using sodium hypochlorite, hydrogen peroxide with peroxyacetic acid, and soap”. *Plant Dis.* 86:1325–1332, **2002**.

- BEZERRA, M. DE A., ARRUDA, M. A. Z., & FERREIRA, S. L. C. "Cloud Point Extraction as a Procedure of Separation and Pre-Concentration for Metal Determination Using Spectroanalytical Techniques: A Review". *Applied Spectroscopy Reviews*, 40: 269–299, **2005**.
- BEZERRA, M. A. & FERREIRA, S. L. "Extração por ponto nuvem: Princípios e aplicações em química Analítica." Vitória da Conquista - UESB 2006, 165p.
- BROCENSCHI, R. F.; ROCHA-FLHO, R. C.; DURAN, B. & SWAIN, G. M. "The analysis of estrogenic compounds by flow injection analysis with amperometric detection using a boron-doped diamond electrode". *Talanta*, 126: 12-19, **2014**.
- CABRAL, M. F.; SOUZA, D.; ALVES, C. R.; MACHADO, S. A. S. "Estudo do comportamento eletroquímico do herbicida ametrina utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada". *Ecl. Quím.*, 28:41-47, **2003**.
- CAIXETA-NETA, A., RIBEIRO, G. C., DE AMORIM, K. P., & ANDRADE, L. S. "Electrochemical determination of thiabendazole pesticide extracted and preconcentrated from tomato samples by cloud point extraction." *Anal. Methods*, 12, 5823-5832, **2020**.
- CARABIAS-MARTINEZ, R.; RODRIGUEZ-GONZALO, E.; MRENO-CORDERO, B.; PÉREZ-PAVÓN, J. L; GACIA-PINTO, C. & LAESPADA, E. F. "Sufactant cloud point extraction and preconcentration of organic compounds prior to chromatography and capillary electrophoresis". *J.Chromatogr. A*, 902: 251-265, **2000**.
- COSTA, B. E.S. "Extração Seletiva por Ponto Nuvem Para Pré-Concentração e Especificação de Arsênio Inorgânico em Matriz Alimentícia Empregando Espectrometria de Absorção Atômica Eletrotérmica em Forno de Grafite". Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Goiás, Catalão, 2013, 103p.
- COSTA, I. M., CODOGNOTO, L., & VALLE, E. M. A. "Voltammetric and spectroscopic studies of the interaction between copper (II) ions with the pesticide carbendazim and its effect in the soil". *J. Solid State Electrochem.* 22:1563–1570, **2017**.
- DE AMORIM, K. P.; ANDRADE, L. S. Development and application of a cloud point method for the extraction of natural estrogens E1 and E2 from urine samples and their simultaneous determination by HPLC-EC using a BDD electrode. *Analytical Method*, 9:1627-1633, 2017.
- DE LIMA, R. M. F.; SILVA, M. D. O.; FELIX, F. S.; ANGNES, L.; SANTOS, W. T. P.; SACZK, A. A. Determination of Benzocaine and Tricaine in Fish Fillets Using BIA with Amperometric Detection. *Electroanalysis*, v. 30, p. 283-287, **2018**.
- DÍAZ-ÁLVAREZ, M., TURIEL, E., & MARTÍN-ESTEBAN, A. "Molecularly imprinted polymer monolith containing magnetic nanoparticles for the stir-bar sorptive extraction of thiabendazole and carbendazim from orange samples". *Anal. Chim. Acta*, 1045, 117-122, **2019**

DONG Y, YANG L, ZHANG L. “Simultaneous electrochemical detection of benzimidazole fungicides carbendazim and thiabendazole using a novel nanohybrid material-modified electrode”. *J Agric Food Chem* 65:727–736. **2017**.

DORNELLAS, R. M.; MUNOZ, R.A.A. & AUCELIO, R.Q. “Electrochemical determination of picoxystrobin on boron-doped diamond electrode: square-wave voltammetry versus BIA-multiple pulse amperometry”. *Microchem. J.* v.123, 1-8, **2015**.

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

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

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

FREITAS, J. M., OLIVEIRA, T. C., SANTANA, M. H. P., BANKS, C. E., MUNOZ, R. A. A., AND RICHTER, E. M. “A simple and fast-portable method for the screening of the appetite-suppressant drugs ibutramine in natural products and multivitamin supplements”. *Sensors Actuators B Chem.* 282, 449–456. **2018**.

FUJISHIMA, A.; RAO, T. N.; POPA, E.; SARADA, B. V.; YAGI, I.; TRYK, D. A. “Electroanalysis of dopamine and NADH at conductive diamond electrodes”. *J. Electroanal. Chem.* 473: 179-185, **1999**.

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

GORGA, M.; PETROVIC, M. & BARCELÓ, D. “Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry”. *J Chromatogr. A*, 1295: 57-66, **2013**.

GORTZI, O.; LALAS, S.; CHATZILAZAROU, A.; KATSOYANNOS, E.; PAPACONSTANDINOU, S.; DOURTOGLOU, E. “Recovery of natural antioxidants from olive mill wastewater using Genapol-X080”. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 85:133–140, **2008**.

GUO, Y.; GUO, S.; LI, J.; WANG, E.; DONG, S. “Cyclodextrin–graphene hybrid nanosheets as enhanced sensing platform for ultrasensitive determination of carbendazim”. *Talanta*, 84:60–64, **2011**.

HUPERT, M.; MUCK, A.; WANG, J.; STOPPER, J.; CVAKOVA, Z.; HAYMOND, S.; SHOW, Y. & SWAIN, G. M. “Conductive diamond thin-films in electrochemistry”. *Diam. Relat. Mater.* 12: 1940-1949, **2003**.

- IAC. Instituto Agrônomo de Campinas. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/frutas/frutiferas_cont.php?nome=Morango>. Acesso em: 28 de Agosto de **2018**.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/774#resultado>>. Acesso em: 01 de Junho de **2018**.
- LEE, H. S.; RAHMAN, M. MD.; CHUNG, H. S.; KABIR, H.; YOON, KWANG-S.; CHO, SOON-K.; A.M. ABD EL-ATY.; SHIM, JAE-HAN. “Aneffectivemethodology for simultaneousquantificationofthiophanate-methyl, and its metabolite carbendazim in pear, using LC-MS/MS”. *J Chromatogr. A*, 1095:1-5, 2018.
- LI, J.; MA, X.; ZHANG, M.; LI, D.; YUAN, Y.; FAN, Y.; XIE, X.; GUO, L. & ZENG, G. “Preparation of Molecularly Imprinted Polymer Sensor on Electrochemically Reduced Graphene Oxide Modified Electrode for Selective Probing of Thiabendazole” *J. Electrochem. Soc.* 166, B84, **2019**.
- LIMA, T.; SILVA, H. T. D.; LABUTO, G.; SIMÕES, F. R.; CODOGNOTO, L. “An experimental design for simultaneous determination of Carbendazim and Fenamiphos by electrochemical method”. *Electroanalysis*, 28 : 817- 822, **2016**
- LOPES, E. da L. “Estudo e determinação das condições experimentais da reação de silição utilizada na análise multirresíduo de anti-inflamatórios não-esteróides em matrizes aquosas ambientais por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa”. Monografia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, **2011**, 75p.
- MAXIMIANO, E. M., CARDOSO, C. A. L. & ARRUDA, G. J. “Simultaneous electroanalytical determination of Thiram and Carbendazim in samples of fresh fruit juices in the presence of surfactants”. *Food Anal. Methods* 13, 119–130, **2019**.
- MAZELLIER, P.; LEROY, E. & LEGUBE, B. “Photochemical behavior of the fungicide carbendazim in dilute aqueous solution”. *J. Photochem. Photobiol. A*, 153:221-227, **2002**.
- MELGAR, L.Z. “Estudo das interações entre os fungicidas (Carbendazim e Fuberidazole) e as partículas de argila em suspensão aquosa. Adsorção, fotofísica e fotoquímica.” Monografia, Universidade de São Paulo, São Carlos, **2009**, 128p.
- MONTES, R. H. O.; DORNELLAS, R. M.; SILVA, L. A. J.; SQUISSATO, A. L.; RICHTER, E. M. ; MUNOZ, R. A. A. “Amperometric determination of the insecticide fipronil using batch injection analysis: comparison between unmodified and carbon-nanotube-modified electrodes”. *J. Solid State Electrochem.* , 20: 2453-2459, **2016**.
- MORAL, A., SICILIA, M. D., & RUBIO, S. “Determination of benzimidazolic fungicides in fruits and vegetables by supramolecular solvent-based microextraction/liquid chromatography/fluorescence detection”. *Anal. Chim. Acta*, 650: 207-213, **2009**.
- MORINAGA, H., YANASE, T., NOMURA, M., OKABE, T., GOTO, K., HARADA, N., &NAWATA, H. “A Benzimidazole Fungicide, Benomyl, and Its Metabolite, Carbendazim, Induce Aromatase Activity in a Human Ovarian Granulose-Like Tumor Cell Line (KGN)”. *Endocrinology*, 145:1860–1869, **2004**.

MUKHERJEE, P.; PADHAN, S. K.; DASH, S.; PATEL, S. & MISHRA, B. K. "Clouding behavior in surfactant systems". *Adv. Colloid Interfac.*, 162: 59–79, **2011**.

NEZAMZADEH-EJHIEH, A.; BADRI, A. Application of surfactant modified zeolite membrane electrode towards potentiometric determination of perchlorate. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 660, n. 1, p. 71–79, **2011**.

NOYROD, P.; CHAILAPAKUL, O.; WONGSAWAT, W. & CHUANUWATANAKUL, S. "The simultaneous determination of isoproturon and carbendazim pesticides by single drop analysis using a graphene-based electrochemical sensor". *J. Electroanal. Chem.* 719:54–59, **2014**.

OLIVEIRA, F. M. ; FERREIRA, P. A. ; NEVES, C. G. ; ROSA, T. M. ; SANTOS, W. T. P. ; MELO, E. I. ; SILVA, R. A. B. Fast Screening and Determination of Tadalafil in Pharmaceuticals by Batch Injection Analysis (BIA) with Amperometric Detection. *Electroanalysis*, v. 32, p. xx-xx, **2020**

OLIVEIRA, G. K. F.; TORMIN, T. F.; DE'O.MONTES, R. H.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. A. "Electrochemical Oxidation of Astaxanthin on Glassy-carbon Electrode and its Amperometric Determination Using Batch Injection Analysis (BIA)". *Electroanalysis*, v.28, p.2143 - 2148, **2016**.

OLIVEIRA, T. C. Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos empregando análise por injeção em batelada para a determinação de nafazolina, zinco, feniramina e clorfeniramina em formulações farmacêuticas. Dissertação de Mestrado. UFU, Instituto de Química, **2015**, 110 p.

PALEOLOGOS, E. K.; GIOKAS, D. L. & KARAYANNIS, M. I. "Micelle-mediated separation and cloud-point extraction". *Trac-Trend. Anal. Chem.*, 24: 426-436, **2005**.

PEREIRA, G. F.; ROCHA-FILHO, R. C.; BOCCHI, N.; BIAGGIO, S. R. "Electrochemical degradation of bisphenol A using a flow reactor with a boron-doped diamond anode". *Chem. Eng. J.*, 198: 282-288, **2012**.

PEREIRA, P. F.; SILVA, W. P. D.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Fast and simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim using batch injection analysis with amperometric detection and boron-doped diamond electrode. *Química Nova*, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 663-668, jun. **2015**.

PLESKOV, Y. V. "Synthetic diamond, a new electrode material for electroanalysis". *J. Anal. Chem.*, 55:1045, **2000**.

PREECHAWORAPUN, A.; CHUANUWATANAKUL, S.; EINAGA, Y.; GRUDPAN, K.; MOTOMIZU, S. & CHAILAPAKUL, O. "Electroanalysis of sulfonamides by flow injection system/high-performance liquid chromatography coupled with amperometric detection using boron-doped diamond electrode". *Talanta*, 68: 1726-1731, **2006**.

QUINA, F. H.; ALONSO, E. O.; FARAH, J. P. S. Incorporation of nonionic solutes into aqueous micelles: a linear solvation free energy relationship analysis. *J. Phys. Chem.*, 99: 11708-11714, **1995**.

RADI, A.; EL-GRANY, N. A.; WAHDAN, T. “Voltammetric behaviour of rabeprazole at a glassy carbon electrode and its determination in tablet dosage form”. *Il Farmaco*, 59: 515-518, **2004**.

RAZZINO C. A.; SGOBBI, L. F.; CANEVARI, T. C.; CANCELO, J.; MACHADO, S. A. S. “Sensitive determination of carbendazim in orange juice by electrode modified with hybrid material”. *Food Chem* 170:360–365, **2015**.

RIBEIRO, W. F.; SELVA, T. M. G.; LOPES, I. C.; COELHO, E. C. S.; LEMOS, S. G.; CAXICO DE ABREU, F.; NASCIMENTO, V. B. & ARAUJO, M. C. U. “Electroanalytical determination of carbendazim by square wave adsorptive stripping voltammetry with a multiwalled carbon nanotubes modified electrode”. *Analytical Methods*, 3: 1202–1206, **2011**.

RIBEIRO, F. W. P., DE OLIVEIRA, R. C., DE OLIVEIRA, A. G., NASCIMENTO, R. F., BECKER, H., DE LIMA-NETO, P. & CORREIA, A. N.” Electrochemical sensing of thiabendazole in complex samples using boron-doped diamond electrode”. *J. Electroanal. Chem.*, 866, 114179, **2020**.

ROCHA, S. A. N. “Extração em ponto nuvem com derivatização do surfactante: uma alternativa para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em águas naturais por cromatografia gasosa”. Salvador. Programa de Pós-Graduação em química-UFB, **2013**. Tese de Doutorado, 101p.

ROCHA, T. M.; GONÇALVES, E. C. B. A. & FARIA, M. V. C. “Lavagem e sanitização em maçã (*Malus Doméstica Borkh.*) cultivar Royal Gala: avaliação na redução de pesticidas organofosforados”. *Alim. Nutr.*, Araraquara v. 21, n. 4, p. 659-665, **2010**.

SANTALAD, A.; SRIJARANAI, S.; BURAKHAM, R.; GLENNON, J. D. & DEMING, R. L. “Cloud-point extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography for the determination of carbamate insecticide residues in fruits”. *Anal Bioanal Chem*, 394:1307–1317, **2009**.

SANTOS, K. D.; BRAGA, O. C.; VIEIRA, I. C.; SPINELLI, A. “Electroanalytical determination of estriol hormone using a boron-doped diamond electrode”. *Talanta*, 80: 1999-2006, **2010**.

SILVA, S. G. “Desenvolvimento de procedimentos limpos para extração de íons metálicos em ponto nuvem”. Dissertação de Mestrado Universidade de São Paulo, São Paulo, **2008**, 83p.

SILVA, T. A.; ZANIN, H.; MAY, P. W.; CORAT, E. J. & FATIBELLO-FILHO, O. “Electrochemical performance of porous diamond-like carbon electrodes for sensing hormones, neurotransmitters, and endocrinedisruptors”. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 6:21086-21092, **2014**.

SILVA, W. P. “Determinação simultânea de propifenazona, paracetamol e cafeína utilizando eletrodo de diamante dopado com boro”. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química, **2017**, 96 p.

SILVA, W. P., SILVA, L. A. J., FRANÇA, C. H., SOUSA, R. M. F., MUÑOZ, R. A. A., & RICHTER, E. M. “Square-wave voltammetric determination of propyphenazone, paracetamol, and caffeine: comparative study between batch injection analysis and conventional electrochemical systems”. *Electroanalysis*, 29, 1860–1866, **2017**.

SIMÕES, F. R.; VAZ, C. M. P.; BRETT, C. M. A. Electroanalytical Detection of the Pesticide Paraquat by Batch Injection Analysis. *Analytical Letters*, v. 40, n. 9, p. 1800–1810, **2007**.

SUFFREDINI, H. B.; PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L.; MACHADO, S. A. S.; ROCHA-FILHO, R. C. & AVACA, L. A. “Enhanced electrochemical response of borodoped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment”. *Electrochim. Acta*, 49:4021-4026, **2004**.

VOPHAM, T.; BERTRAND, K. A.; HART, J. E.; LADEN, F.; BROOKS, M. M.; YUAN, J.-M. WEISSFELD, J. L. “Pesticide exposure and liver cancer: a review”. *Cancer Causes & Control*, 28: 177–190, **2017**.

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

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

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

WU, Y-W.; JIANG, Y-Y.; LIU, J-F. & XIONG, K. “Cloud point extraction combined with micellar electrokinetic capillary chromatography determination of benzophenones in cosmetic matrix.” *Electrophoresis*, 29: 819-826, **2008**.

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**.

YAMADA, H.; YOSHIZAWA, K. & HAYASE, T. “Sensitive determination method of estradiol in plasma using highperformance liquid chromatography with electrochemical detection”. *J. Chromatogr. B*, 775: 309-213, **2002**.

YANG, J.; ZHANG, D.; WANG, L.; LONG, N.; ZHANG, M.; ZHANG, L. “An electrochemical method for high sensitive detection of Thiabendazole and its interaction with human serum albumin”. *Food Anal. Methods*, 8, 507-514, **2015**.

YAO, B. J. & YANG, L. “Ultrasonic assisted cloud point extraction of polyaromatic hydrocarbons.” *Separ. Sci. Technol.*, 42: 1843-1858, **2007**.

ZHANG, Z. Y.; LIU, X. J.; HONG, X. Y. “Effects of home preparation on pesticide residues in cabbage”. *Food Control*. 18:1484– 1487, **2007**.

ZHU, X.; YANG, J.; LIU, M.; WU, Y.; SHEN, Z. & LI, G. “Sensitive detection of human breast cancer cells based on aptamer–cell–aptamer sandwich architecture”. *Anal.Chim. Acta*, 764: 59-63, **2013**.

APÊNCICE A – Voltametrias cíclicas do CBZ e seus respectivos brancos com variação de pH

