



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO *ECO-FRIENDLY* PARA DETERMINAÇÃO DE
DEFENSIVOS AGRÍCOLAS POR HPLC/DAD**

LARISSA PASSOS DOS SANTOS

Salvador-BA

2021

LARISSA PASSOS DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO *ECO-FRIENDLY* PARA DETERMINAÇÃO DE
DEFENSIVOS AGRÍCOLAS POR HPLC/DAD**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química Aplicada da Universidade do Estado da Bahia
para obtenção do título de Mestre em Química Aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Débora de Andrade Santana

Coorientador: Prof. Dr. Madson de Godoi Pereira

Salvador-BA

2021

FICHA CATALOGRÁFICA
Sistema de Bibliotecas da UNEB

S237d

Santos, Larissa Passos dos

Desenvolvimento de método eco-friendly para determinação de defensivos agrícolas por HPLC/DAD / Larissa Passos dos Santos. - Salvador, 2021.

69 fls : il.

Orientador(a): Profª Drª Débora de Andrade Santana.

Coorientador(a): Prof. Dr. Madson de Godoi Pereira.

Inclui Referências

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências Exatas e da Terra. Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada - PGQA, Campus I. 2021.

1. Química analítica. 2. Química verde. 3. Alimentos - contaminação. 4. Pesticidas.

CDD: 543

UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA

Autorização Decreto nº 9237/86, DOU 18/07/96. Reconhecimento: Portaria 909/95, DOU 01/08-95

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
CAMPUS I - SALVADOR



FOLHA DE APROVAÇÃO

"DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ECO-FRIENDLY PARA DETERMINAÇÃO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS POR HPLC/DAD"

LARISSA PASSOS DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada – PGQA, em 10 de dezembro de 2021, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Química Aplicada pela Universidade do Estado da Bahia, conforme avaliação da Banca Examinadora:

Debora de Andrade Santana

Professor(a) Dr.(a) DEBORA DE ANDRADE SANTANA
UNEB
Doutorado em Química
Universidade Federal da Bahia

Madson de Godoi Pereira

Professor(a) Dr.(a) MADSON DE GODOI PEREIRA
UNEB
Doutorado em Química
Universidade Estadual de Campinas

Walter Nei Lopes dos Santos

Professor(a) Dr.(a) WALTER NEI LOPES DOS SANTOS
UNEB
Doutorado em Química
Universidade Federal da Bahia

Luciana Bitencourt Oliveira

Professor(a) Dr.(a) LUCIANA BITENCOURT OLIVEIRA
IFS
Doutorado em Geografia
Universidade Federal de Sergipe

Assim como todas as conquistas, dedico a
Deus e aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela dádiva da vida e por me conceder razões para desenvolver esse trabalho.

Aos meus pais, Jane e Onivan, pelas oportunidades, incentivo e compreensão em toda a minha trajetória.

À minha irmã Emile e meu sobrinho Luís Gustavo, por estarem sempre presentes nas minhas conquistas.

Ao meu marido, Lucas, por todo carinho, cuidado e por ser sempre companheiro e disponível para me ouvir e me divertir nos momentos necessários.

Ao meu filho, Yuri, que ainda não chegou, mas já fez a diferença me dando forças para continuar.

À professora Débora, pela orientação, apoio, paciência, compreensão, confiança e por nunca ter me deixado desistir.

Ao professor e coorientador, Madson, que eu tanto admiro, por ter aceitado fazer parte desse projeto.

Aos colegas da turma de 2019, com quem dividi momentos de angústia e alegria. Principalmente à Andréa, por toda a vivência desde a graduação. Sem vocês esse período não teria sido igual.

À Bárbara, muito mais que uma companhia de laboratório, por todos os momentos de descontração, apoio e auxílio em todas as etapas desse trabalho, principalmente na reta final.

À técnica Antônia, pela disponibilidade, carinho e apoio sempre que necessário.

Aos professores do PGQA por todos os ensinamentos.

Aos professores Luciana Bitencourt e Walter Lopes, por terem aceitado fazer parte da composição desta banca avaliadora.

Aos professores Aníbal de Freitas Júnior e Vitor Hugo Mígues, pelo aceite do convite e disponibilidade para avaliadores suplentes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

À Universidade do Estado da Bahia (UNEB), por toda a formação e infraestrutura para a realização dessa pesquisa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente com essa jornada.

“O conhecimento nos faz responsáveis”.
(Che Guevara)

RESUMO

O trabalho apresentado demonstra e discute o desenvolvimento de método cromatográfico para separação e determinação de oito defensivos agrícolas com atendimento aos critérios da Química Verde, através da substituição da fase móvel do método cromatográfico de referência por um solvente menos agressivo ecologicamente. A análise de defensivos agrícolas se faz necessária devido à elevada taxa de liberação desses compostos, pelo governo brasileiro, nos últimos anos e consequentemente maior contaminação de variados ecossistemas, podendo chegar inclusive às mesas dos consumidores. Essas substâncias possuem uso liberado para uma gama de plantações e no Brasil, os teores para utilização são apresentados nos índices monográficos da ANVISA. A determinação analítica de defensivos agrícolas envolve etapas que podem ser realizadas através de diferentes técnicas associadas a variados métodos que vem sendo desenvolvidos e validados com o objetivo de apresentar maior confiabilidade, além do atendimento aos requisitos da legislação e atualmente apresentando propostas baseadas nos princípios da Química Verde. Nesse sentido, o método desenvolvido apresentou bons resultados com valores de fator de retenção (k), fator de separação (α), número de pratos teóricos (N) e resolução (R_s) acima dos valores estabelecidos para boas separações cromatográficas. Além disso, apresentou resultados excelentes para as métricas de análise verde com alta pontuação na eco-escala e boa apresentação no pictograma de NEMI. A análise também apresentou valores que indicaram a linearidade do método com boa precisão, seletividade e sensibilidade com limites de detecção e quantificação nas faixas de 0,50 a 0,94 mg L⁻¹ e 0,74 a 1,81 mg L⁻¹, respectivamente.

Palavras-chave: HPLC. Química Verde. Pesticidas. Contaminação de alimentos.

ABSTRACT

This paper is aimed at demonstrating and discussing the development of a chromatographic method for the separation and determination of eight pesticides in compliance with the Green Chemistry criteria, through the replacement of the mobile phase of the reference chromatographic method by a solvent that is less ecologically aggressive. The analysis of pesticides is necessary due to the high rate of pesticide approvals by the Brazilian government in recent years, and consequential greater contamination of various ecosystems, which may even reach the tables of consumers. These substances have been approved for use in a range of crops and in Brazil the levels for usage are presented in the monographic indexes of ANVISA. The analytical determination of pesticides involves steps that can be performed using different techniques associated with various methods that have been developed and validated in order to provide greater reliability, in addition to meeting the requirements of legislation and currently presenting proposals based on the principles of Green Chemistry. In this regard, the developed method has shown good results with values of retention factor (k), separation factor (α), number of theoretical plates (N) and resolution (R_s) above the values established for good chromatographic separations. Furthermore, it has presented excellent results for the green analytics metrics with high scores on the eco-scale and good presentation on the NEMI pictogram. The analysis also presented values that indicated the linearity of the method with good precision, selectivity and sensitivity with detection and quantification limits ranging from 0.50 to 0.94 mg L⁻¹ and 0.74 to 1.81 mg L⁻¹ respectively.

Keywords: HPLC. Green Chemistry. Pesticides. Food contamination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução dos registros dos defensivos agrícolas no Brasil.....	18
Figura 2 – Comparação dos perfis ecologicamente amigáveis de dois supostos métodos analíticos.	36
Figura 3 – Cromatograma resultante da mistura de padrões de quatorze defensivos agrícolas (1,00 mg L ⁻¹) com o gradiente do método de referência.....	40
Figura 4 – Cromatograma resultante da mistura de padrões de quatorze defensivos agrícolas (1,00 mg L ⁻¹) com o gradiente do primeiro método adaptado.....	41
Figura 5 – Cromatograma resultante da mistura de padrões de quatorze defensivos agrícolas (1,00 mg L ⁻¹) com o gradiente otimizado.....	42
Figura 6 – Cromatogramas obtidos em diferentes temperaturas.	45
Figura 7 – Cromatogramas obtidos em diferentes fluxos de vazão da fase móvel. .	46
Figura 8 – Cromatograma obtido sob condições ótimas.	47
Figura 9 – Cromatograma obtido sob condições ótimas em novo equipamento.	48
Figura 10 – Cromatograma com integração da atrazina.	49
Figura 11 – Pictograma NEMI para o método proposto.	52
Figura 12 – Pictograma NEMI para o método de Barchanska e colaboradores (2012).	52
Figura 13 – Esquema indicativo do teor verde dos solventes comumente utilizados em Química Analítica.	53
Figura 14 – Gráficos dos resíduos.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Determinação de defensivos agrícolas em diferentes matrizes por HPLC.	28
Tabela 2 – Pontos de penalidade (PPs) para eco-escala analítica.	37
Tabela 3 – Parâmetros de avaliação da separação cromatográfica com o primeiro método adaptado.	43
Tabela 4 – Parâmetros de avaliação da separação cromatográfica do método com gradiente otimizado.	43
Tabela 5 – Parâmetros de avaliação da separação cromatográfica em novo equipamento HPLC.	49
Tabela 6 – Parâmetros e coeficientes de determinação das curvas analíticas de injeção direta.	55
Tabela 7 – Precisão intra-dia expressa pelo desvio padrão relativo obtido em 1,00 mg L ⁻¹	58
Tabela 8 – Precisão inter-dia expressa pelo desvio padrão relativo obtido em 1,00; 3,00 e 5,00 mg L ⁻¹	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE – Cromatografia Líquida de alta eficiência

DAD – *Diode-Array Detection*

EPA US - *United States Environmental Protection Agency*

EC – Eletroforese Capilar

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

NEMI - *National Environmental Methods Index*

PBT – Persistente, Bioacumulativo e Tóxico

RSD – *Relative Standard Deviation*

TRI – *Toxics Release Inventory*

UV-Vis – Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1	DEFENSIVOS AGRÍCOLAS	16
2.1.1	Definição e classificação	16
2.1.2	Utilização	17
2.1.3	Efeitos nocivos	19
2.2	TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPREGADAS NA DETERMINAÇÃO DOS DEFENSIVOS AGRÍCOLAS	20
2.2.1	Eletroforese capilar	21
2.2.2	Cromatografia gasosa	22
2.2.3	Cromatografia líquida de alta eficiência	23
2.3	PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS EM ALIMENTOS	24
2.3.1	Procedimentos de extração convencionais	24
2.3.2	Procedimentos de extração verde	26
3	JUSTIFICATIVAS	30
4	OBJETIVOS	31
4.1	OBJETIVO GERAL	31
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
5	MATERIAIS E MÉTODOS	32
5.1	REAGENTES E SOLUÇÕES	32
5.2	DESENVOLVIMENTOS DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA	32
5.3	PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO	32
5.3.1	Tempo de retenção (t_r)	33
5.3.2	Número de pratos teóricos (N)	33
5.3.3	Fator de retenção (k)	33
5.3.4	Fator de separação (α)	34
5.3.5	Resolução (R_s)	34
5.3.6	Altura dos pratos teóricos (H)	34

5.4	OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV DOS COMPOSTOS ESTUDADOS.....	35
5.5	MÉTRICAS DE AVALIAÇÃO PARA MÉTODO VERDE	35
5.6	VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS	37
5.7	SOFTWARES UTILIZADOS NO TRATAMENTO DOS DADOS	38
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
6.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	39
6.2	ANÁLISE DE MÉTODO VERDE	50
6.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO INSTRUMENTAL	54
6.3.1	Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ).....	54
6.3.2	Linearidade.....	55
6.3.3	Precisão.....	57
6.3.4	Robustez.....	59
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
8	PERSPECTIVAS.....	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

Segundo o *National Research Council* (Consenho Nacional de Pesquisa dos Estados Unidos), defensivos agrícolas são substâncias químicas ou misturas de substâncias utilizadas para prevenir, destruir, repelir ou inibir a ocorrência ou efeito de organismos vivos capazes de prejudicar as lavouras agrícolas, quanto ao cultivo, estocagem ou transporte (SILVA e COSTA, 2012). Esses defensivos agrícolas utilizados em todo o mundo são classificados seguindo alguns critérios como sua origem, estrutura química e organismo alvo.

No final da década de 1940, houve no Brasil, de acordo com Khush (2001), o aumento da produção agrícola, trazendo, para a sociedade, vantagens com relação à tecnologia e desenvolvimento de pesquisas e desvantagens como o amplo uso de substâncias sintéticas. Nesse panorama, o emprego cada vez mais acentuado dos defensivos agrícolas, tanto para aumentar o rendimento das colheitas, quanto para garantir a qualidade de armazenamento de grãos, tem gerado preocupações ambientais/toxicológicas crescentes.

De todo modo, é importante destacar que algumas dessas substâncias possuem uso liberado em diversos tipos de plantações, com teores controlados pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) em seus índices monográficos. Contudo, ainda que haja um controle com relação aos usos, o aumento desenfreado dessas liberações tem causado espanto à sociedade, pois de acordo com Steffen, Steffen e Antonioli (2011) os defensivos agrícolas utilizados se espalham no meio ambiente de diferentes formas, alcançando variadas espécies nos ecossistemas e podendo, inclusive, chegar à mesa dos consumidores. Por esse motivo há uma preocupação com a contaminação indireta por defensivos agrícolas e há a necessidade do monitoramento dessas substâncias (NAREDERAN, MEYYANATHAN e BABU, 2020).

Frente ao exposto, a contaminação por defensivos agrícolas já é considerada um problema de saúde pública (RIGOTTO, VASCONCELOS e ROCHA, 2014), devido ao montante de pessoas contaminadas por essas substâncias em diferentes ambientes. Isso corrobora com o fato que a exposição a defensivos agrícolas ocasiona riscos para a saúde, como o desenvolvimento de doenças graves devido à toxicidade desses compostos (KIM, KABIR e JAHAN 2017; MOSTAFALOU e ABDOLLAHI 2017; SAMSIDAR, SIDDIQUEE e SHAARANI 2018).

E é nessa tentativa de minimizar os impactos para a sociedade e o meio ambiente, que se faz necessária a adoção de análises que determinem os teores desses microcomponentes em diferentes matrizes. Segundo Balesteros (2009), diversas técnicas podem ser empregadas para a análise de defensivos agrícolas, como a cromatografia gasosa – CG (STOCKA *et al.* 2011; AMÓRTEGUI e DALLOS 2015; BRONDI *et al.* 2011; CAJKA *et al.* 2012; SAMSIDAR, SIDDIQUEE e SHAARANI 2018; ŁOZOWICKA, RUTKOWSKA e JANKOWSKA 2017; XIAO *et al.* 2016; FARAJZADEH *et al.* 2016), os métodos eletroquímicos, a cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE (BARCHANSKA *et al.* 2012; ASENSIO-RAMOS *et al.* 2011; TIAN 2011; PIRSAHEB e FATTAHI 2018) em fase reversa e a eletroforese capilar – EC (JUAN-GARCÍA, FONT e PICÓ 2005; HERNÁNDEZ-BORGES *et al.* 2004; BOL'SHAKOV e AMELIN 2016; XU *et al.* 2015; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ *et al.* 2014; DANIEL *et al.* 2015). Essa variedade de técnicas analíticas está relacionada à necessidade cada vez maior de determinação e quantificação dessas substâncias em uma grande diversidade de matrizes, devido à demanda da eliminação ou supressão dos resíduos de defensivos agrícolas (Raza e Kim, 2018) e suas interações com os organismos consumidores.

As técnicas citadas são convencionais e amplamente usadas para a determinação de defensivos agrícolas devido à alta sensibilidade, seletividade e confiabilidade, mas é necessário aliar, à técnica, segundo Samsidar, Siddiquee e Shaarani (2018), procedimentos de preparação da amostra (extração, purificação e pré-concentração), que corroborem com as vantagens da técnica, garantindo baixos limites de detecção (KAUR *et al.*, 2021). Nesse sentido, as técnicas que envolvem solventes tóxicos ainda são largamente aplicadas, porém aquelas baseadas nos princípios da Química Verde têm ganhado cada vez mais espaço, com propostas mais baratas e com menor geração de resíduos de toxicidade elevada e consumo consciente de reagentes e energia elétrica. Nesse contexto, tem ocorrido um aumento no desenvolvimento e validação de métodos confiáveis e que atendam aos requisitos da legislação, de modo que possuam caráter *Eco-Friendly*, com proposta de consumo consciente aos efeitos para o meio ambiente.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 DEFENSIVOS AGRÍCOLAS

2.1.1 Definição e classificação

Segundo o *National Research Council*, defensivos agrícolas são substâncias químicas ou misturas de substâncias utilizadas para prevenir, destruir, repelir ou inibir a ocorrência ou efeito de organismos vivos capazes de prejudicar as lavouras agrícolas, quanto ao cultivo, estocagem ou transporte (SILVA e COSTA, 2012). O termo defensivo agrícola tem ampla utilização em seu setor de produção por denotar menor ênfase aos seus malefícios quando comparado à palavra agrotóxico, de cunho depreciativo. No Brasil, o termo agrotóxico passou a ser definido pela Lei 7.802, cujo artigo 2º estabelece:

Art. 2º Para os efeitos desta Lei, consideram-se:

I - agrotóxicos e afins:

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

b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento;

II - componentes: os princípios ativos, os produtos técnicos, suas matérias-primas, os ingredientes inertes e aditivos usados na fabricação de agrotóxicos e afins.

O termo agrotóxico é utilizado somente no Brasil, enquanto nos demais países todas as substâncias compreendidas pela Lei 7.802/1989 são denominadas pesticidas (BARONAS, 2019). No entanto, para o português brasileiro o termo pesticida seria muito específico, assim como fungicida, inseticida, acaricida, dentre outros vocábulos utilizados para classes de defensivos agrícolas. Ainda para Baronas (2019), o termo pesticida também não se torna adequado quando se designa a pestes, sendo que nem toda necessidade de aplicação se deve a causas de pestes.

Do mesmo modo, o termo pesticida não é indicado por Peres e Moreira (2003), pois esse termo implica no entendimento de que há apenas a morte de pestes, bem como praguicidas é associado apenas à morte de pragas. Tendo em vista que os

maiores riscos associados à utilização dessas substâncias estão no modo inadequado de preparo e aplicação, o ideal é a utilização de um termo mais abrangente, como defensivos agrícolas.

Os defensivos agrícolas são classificados de acordo com sua origem, estrutura química e organismo alvo. Quanto à natureza química, são categorizados em inorgânicos e orgânicos. Em relação à origem, podem ser sintéticos (produzidos sinteticamente) ou biológicos (de fontes naturais, como plantas e bactérias). Os sintéticos são agrupados em classes: organoclorado, organofosforado, carbamato, piretroides sintéticos, ciclodieno, nicotinoide e triazol. Referente ao alvo, são classificados como inseticida, herbicida, fungicida, raticida, rodenticida, nematocida (NARENDERAN, MEYYANATHAN e BABU, 2020).

2.1.2 Utilização

No final da década de 1940, houve, no Brasil, um estouro do que já estava acontecendo em grande parte dos países subdesenvolvidos: a ideia de aumentar a produção agrícola, posteriormente chamada de Revolução Verde. Essa revolução trouxe, para a sociedade, vantagens como a modernização de equipamentos e fomento às pesquisas relacionadas à manipulação genética e defensivos agrícolas e desvantagens como a desvalorização da agricultura de subsistência, o desmatamento e o amplo uso de substâncias sintéticas.

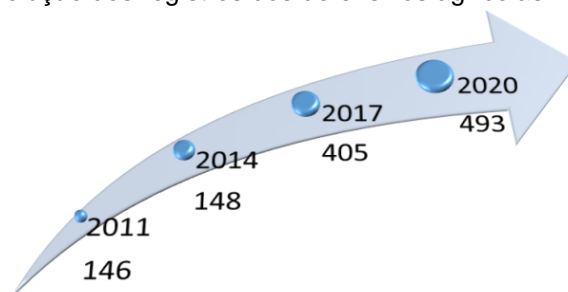
A partir desse momento, a desvantagem relacionada à utilização de defensivos agrícolas aumentou de modo desenfreado. Uma grande variedade de defensivos tem sido usada na agricultura com o objetivo de aumentar a produtividade, que inclui: o rendimento, a qualidade e o tempo de armazenamento das safras. Por conseguinte, a crescente necessidade de uso acompanha o aumento da população e a rápida urbanização (NARENDERAN, MEYYANATHAN e BABU, 2020). Migheli (2017) explica que a acessibilidade a essas substâncias ocorre devido às políticas de reformas agrárias e ao crescimento da renda nas regiões rurais, situações atualmente corriqueiras no nosso território. Porém, as complicações associadas ao uso descontrolado estão além da acessibilidade, mas sim ocasionado, na maioria das vezes, pela toxicidade dessas substâncias ao trabalhador e ao consumidor.

Diversos tipos de defensivos agrícolas podem ser utilizados, a depender das necessidades e formas de aplicação. Em se tratando das necessidades, tem-se por

exemplo, os grupos de inseticidas e herbicidas, que são os mais utilizados nos processos de desenvolvimento e colheita de plantações, empregados para exterminar pragas advindas de insetos e para evitar o crescimento de ervas daninhas ou invasoras, respectivamente (SCHNEIDERS, 2018).

É importante destacar que alguns inseticidas e herbicidas possuem uso liberado em diversos tipos de plantações e tem crescido a lista de produtos liberados para uso nos últimos anos. Isso é comprovado com os dados obtidos no sítio eletrônico do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2021), como apresentado na Figura 1, que se refere aos registros efetivados de defensivos agrícolas nos últimos 10 anos. Vale ressaltar que, só no primeiro semestre do ano de 2021, já foram efetivados 230 registros de defensivos agrícolas, número superior aos registros anuais até o ano de 2015.

Figura 1 – Evolução dos registros dos defensivos agrícolas no Brasil



Fonte: MAPA (2021)

O uso contínuo de defensivos agrícolas implica na contaminação do meio ambiente e representa riscos à saúde humana, por isso as agências reguladoras de todo o mundo monitoram essas substâncias (NAREDERAN, MEYYANATHAN e BABU, 2020). Todos os defensivos liberados no Brasil possuem seus teores controlados pela ANVISA, por informações apresentadas nos índices monográficos.

Estes documentos apontam o emprego, por exemplo, de carbaril ($C_{12}H_{11}NO_2$) em plantações de feijão e tomate (BRASIL, 2020c); do ametrina ($C_9H_{17}N_5S$) em plantações de abacaxi, milho e uva (BRASIL, 2021a); do metiocarbe ($C_{11}H_{15}NO_2S$) em plantações de berinjela e fumo (BRASIL, 2020e); da atrazina ($C_8H_{14}ClN_5$) nas plantações de seringueira e sisal (BRASIL, 2020a); de hexazinona ($C_{12}H_{20}N_4O_2$) nas plantações de cana-de-açúcar (BRASIL, 2020d); de metomil ($C_5H_{10}N_2O_2S$) nas plantações de arroz, aveia, soja e trigo (BRASIL, 2021b). Essas orientações indicam, também, que o bendiocarbe ($C_{11}H_{13}NO_4$) não deve ser utilizado em plantações

(BRASIL, 2020b) e proíbe o aldicarbe ($C_7H_{14}N_2O_2S$) e seus derivados desde o ano de 2014 (BRASIL, 2015).

No entanto, além desses, outros inseticidas e herbicidas podem ter ação contaminante devido à proximidade de regiões de aplicações ou a partir da bioacumulação. Contudo, ainda que haja um controle com relação aos usos, o aumento desenfreado dessas liberações tem causado espanto à sociedade.

2.1.3 Efeitos nocivos

A utilização de defensivos agrícolas acarreta uma rede de contaminação que normalmente não é prevista, pois toda aplicação de defensivos chega ao solo e, segundo Steffen, Steffen e Antonioli (2011), após esse contato, as substâncias podem seguir diferentes rotas de espalhamento, atingindo diferentes ecossistemas, que vão interferir na vida de diversos indivíduos e, inclusive, chegar à mesa dos consumidores. Por esse motivo há uma preocupação com a contaminação indireta por defensivos agrícolas.

Produtos, que chegam à mesa dos consumidores, e tiveram como matéria-prima algum vegetal manipulado com defensivo agrícola, por exemplo, podem ter sido contaminados, seja pela aplicação direta ou por águas de irrigação ou pelo vento que transporta o contaminante de uma região à outra. Esse é o fundamento para a preocupação associada ao consumo de derivados vegetais, pois, em sua maioria, seus precursores são cultivados à base de defensivos agrícolas. Rigotto, Vasconcelos e Rocha (2014) reforçam esse perigo ao discutirem sobre os efeitos nocivos à saúde da população após o consumo de alimentos provenientes de áreas sob efeito de defensivos agrícolas e de águas contaminadas. Para garantir a oferta de alimento seguro e proteger a saúde dos consumidores, são estabelecidos os limites máximos de resíduos de defensivos agrícolas, regulamentados por diversas agências nacionais e internacionais, como a ANVISA e a Comissão do *Codex Alimentarius* (SAMSIDAR, SIDDIQUEE e SHAARANI, 2018), respectivamente.

Embora seja de ampla divulgação os males advindos do uso de defensivos agrícolas, existe, ainda, o desdobramento desse risco, quando são realizadas composições e combinações perigosas ao meio ambiente e à saúde humana. Essas combinações, apesar de serem proibidas, vêm sendo realizadas, considerando apenas a visão econômica, ou seja, caracterizando práticas ambientalmente ilegais

sem qualquer preocupação quanto aos limites máximos estabelecidos. Este é um dos motivos que levaram Rigotto, Vasconcelos e Rocha (2014) a enfatizarem que a contaminação por defensivos agrícolas se tornou um problema de saúde pública, devido à amplitude de pessoas contaminadas em diversos meios, a exemplo nas fábricas e áreas agrícolas e seus entornos e também nós, consumidores finais dos alimentos.

Um fator que pode também estar associado ao mau uso dos defensivos agrícolas, é indicado por Recena e Caldas (2008) ao relatarem, em sua pesquisa, que diversos indivíduos de seu público-alvo obtiveram baixos índices de acerto no que se refere à leitura de pictogramas dos produtos utilizados. Ou seja, a dificuldade no entendimento dos rótulos pode ser minimizada através da realização de campanhas educativas sobre o manejo desses produtos, reduzindo o uso incorreto dessas substâncias.

A exposição a defensivos agrícolas ocasiona riscos para a saúde, como o desenvolvimento de doenças graves (câncer, defeitos congênitos, doença pulmonar obstrutiva crônica, infertilidade) conforme apontado por Samsidar, Siddiquee e Shaarani (2018), o que é complementado por Kim, Kabir e Jahan (2017), ao destacarem que a associação dos riscos também ocorre devido à toxicidade dos ingredientes e do nível de exposição, parâmetro que pode ser entendido como a quantidade, frequência ou tempo em que o indivíduo mantém contato com os ingredientes tóxicos.

A importância dessa análise de riscos à saúde humana frente à exposição a defensivos agrícolas é enfatizada por publicações como a de Mostafalou e Abdollahi (2017). Esses autores realizaram um levantamento de inúmeros casos clínicos de doenças, toxicidade reprodutiva e metabólica, bem como interferências no desenvolvimento humano associados ao contato com defensivos agrícolas.

2.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPREGADAS NA DETERMINAÇÃO DOS DEFENSIVOS AGRÍCOLAS

De acordo com Samsidar, Siddiquee e Shaarani (2018), a determinação analítica de defensivos agrícolas envolve, basicamente, as etapas de preparação da amostra (homogeneização, extração e limpeza), separação, detecção e análise de dados. Segundo Balesteros (2009) diversas técnicas podem ser empregadas para a

análise de defensivos agrícolas, como a CG, os métodos eletroquímicos, a CLAE em fase reversa e a eletroforese capilar. Essa variedade de técnicas analíticas está relacionada à necessidade cada vez maior de determinação e quantificação dessas substâncias em uma grande diversidade de matrizes, devido à demanda da eliminação ou supressão dos resíduos de pesticidas (Raza e Kim, 2018) e suas interações com os organismos consumidores. Isso se deve à difusão do uso desses defensivos bem como da necessidade de controle dessa utilização. Nesse sentido, novos métodos são desenvolvidos e validados de modo que demonstrem maior confiabilidade e atendimento aos requisitos da legislação.

2.2.1 Eletroforese capilar

A técnica de separação por eletroforese é, segundo Spudeit, Dolzan e Micke (2012), baseada na presença de um campo elétrico e migração de compostos iônicos ou ionizáveis nessa região. Por muito tempo, essa técnica foi realizada em papel ou gel, no entanto, estão obsoletos e, atualmente, a eletroforese é executada em tubos capilares de sílica fundida, denominando assim a eletroforese capilar.

Segundo Geiger, Hogerton e Bowser (2012), a eletroforese capilar é uma técnica promissora para análises limitadas de amostras e situações em que alto rendimento, velocidade e automação são desejados, além de apresentar boa resolução, possuir baixo custo analítico, simplicidade de operação e baixa demanda de solvente. Essa técnica foi apresentada para análise de defensivos agrícolas em alguns estudos, como citado em Juan-García, Font e Picó (2005), que fizeram a análise quantitativa de seis defensivos agrícolas em frutas, e demonstrado por Hernández-Borges e colaboradores (2004) com uma revisão acerca da utilização dessa técnica para análise de defensivos agrícolas. Outras pesquisas também utilizaram a técnica para amostras ambientais e alimentícias, como pode ser visto em Bol'shakov e Amelin (2016) e em Xu e colaboradores (2015), que realizaram a determinação de fungicidas em amostras vegetais e em suco de uva.

O sistema de eletroforese capilar requer um pequeno volume de injeção de amostra (nanolitros), sendo combinado com detectores altamente sensíveis, como espectrômetro de massas. Exemplo disso, Sánchez-Hernández e colaboradores (2014) desenvolveram um método combinando eletroforese capilar e espectrometria de massa para a determinação simultânea de 7 inseticidas neonicotinoides. Em outro

estudo, Daniel e colaboradores (2015) determinaram um herbicida em caldo de cana e tomate por eletroforese capilar combinada com a espectrometria de massa tandem.

2.2.2 Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa é uma técnica de separação em que a fase móvel é gasosa e a fase estacionária pode ser líquida ou sólida, sendo a líquida mais amplamente utilizada. Segundo Skoog e colaboradores (2006), a técnica gás-líquido é baseada na partição do analito entre a fase móvel gasosa e uma fase líquida imobilizada na superfície de um material sólido inerte de recheio ou nas paredes de um tubo capilar.

A aplicação dessa técnica é comum para analitos voláteis ou termicamente estáveis, permitindo análises qualitativas ou quantitativas. Stocka e colaboradores (2011) ressaltam que a maioria dos defensivos agrícolas é volátil e termicamente estável, podendo ser determinados por cromatografia gasosa.

Há alguns trabalhos voltados para a análise de defensivos agrícolas voláteis. Amórtegui e Dallos (2015) apresentam um relato com aspectos práticos para análise dos resíduos de defensivos agrícolas em frutas. Brondi e colaboradores (2011) demonstram que essa técnica pode ser facilmente aplicada em amostras ambientais, ao realizarem procedimentos com solo e água. Também é possível verificar a versatilidade da aplicação dessa técnica ao considerarmos o desenvolvimento do trabalho de Cajka e colaboradores (2012), que realizaram a determinação de variados defensivos agrícolas em amostras de chá, empregando essa técnica de separação e avaliando diferentes métodos de preparação de amostras.

As análises de defensivos agrícolas por cromatografia gasosa podem ser realizadas, utilizando diversos detectores, como detector de captura de elétrons, detector fotométrico de chama, detector de ionização de chama e detector de nitrogênio-fósforo, além da possibilidade de acoplamento com espectrômetro de massa (SAMSIDAR, SIDDIQUEE e SHAARANI, 2018). Empregando a CG combinada à espectrometria de massa e CG com os detectores de nitrogênio-fósforo e de captura de elétrons, Łozowicka, Rutkowska e Jankowska (2017) analisaram resíduos de pesticidas em solo. Xiao e colaboradores (2016) empregaram cromatografia gasosa e detecção fotométrica de chama para a determinação de pesticidas organofosforados em amostras ambientais de água. Farajzadeh e colaboradores (2016) determinaram

resíduos de pesticidas organofosforados em suco de fruta por CG e detector de ionização de chama.

2.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

Ao empregar como fase móvel um líquido, tem-se a cromatografia líquida, que se divide em clássica e instrumental, esta última chamada CLAE, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High performance liquid chromatography*), que, segundo Skoog e colaboradores (2006), é uma técnica comumente empregada para separação de diversos compostos em uma única amostra, podendo ser utilizada para materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos. A determinação para a cromatografia líquida depende do detector acoplado ao instrumento.

Dentre as vantagens da HPLC, tem-se a alta eficiência, sensibilidade, baixo consumo de reagentes e menor tempo de análise. Collins, Braga e Bonato (2006) destacam ainda a sua versatilidade quanto a amostras e analitos e possibilidade de emprego para fins qualitativos e quantitativos. Para contemplar essas vantagens, em uma análise, faz-se necessário, apenas, que os analitos interajam em diferentes proporções com as fases móvel e estacionária.

Para essa técnica, é importante frisar que há uma gama de possibilidades de análises quando levamos em consideração o detector empregado no equipamento, pois, com isso, obteremos diferentes parâmetros que tornarão a pesquisa única dentro dos seus critérios. Essa consideração foi frisada por Santana (2014) ao sinalizar a necessidade da escolha mais adequada de um detector para a verificação da aplicabilidade da análise. Isso porque os detectores são instrumentos de suma importância em uma análise cromatográfica, pois, com a presença deles ao final do sistema, é possível, além da separação cromatográfica, a determinação dos analitos a partir da utilização dos dados obtidos.

Por isso, muitos trabalhos utilizam essa técnica, como podemos perceber com Pirsahab e Fattahi (2018), que usam o HPLC com detector UV-Vis para análise de seis defensivos agrícolas, com absorvância na região de 190 a 700 nm, em água. No mesmo caminho, Barchanska e colaboradores (2012) utilizaram o detector de arranjo de diodos (DAD, do inglês *Diode-Array Detection*), que possibilita realizar uma varredura para detectar o analito em diferentes comprimentos de onda, visando a análise do defensivo agrícola atrazina em leites de origem animal. O detector de

Fluorescência, mais sensível, que trabalha na região do ultravioleta, é apresentado em Asensio-Ramos e colaboradores (2011) para a determinação de defensivos agrícolas e seus metabólitos em solo. Também é muito utilizado o espectrômetro de massa acoplado ao HPLC, como visto em Tian (2011), que o utiliza para a identificação de 29 defensivos agrícolas em leites.

Existem, ainda, os detectores de Índice de Refração, de baixa seletividade, e os Eletroquímicos, comumente utilizados para a determinação de analitos que podem ser oxidados ou reduzidos, quando expostos a um potencial elétrico. Esses detectores baseados no índice de refração, bem como os eletroquímicos, são raramente utilizados para determinação de defensivos agrícolas ou em combinação com o HPLC, respectivamente.

2.3 PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS EM ALIMENTOS

As técnicas de separação eletroforese capilar, cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência são convencionais e amplamente usadas para a determinação de defensivos agrícolas devido à alta sensibilidade, seletividade e confiabilidade, mas é necessário aliar a essas técnicas analíticas, segundo Samsidar, Siddiquee e Shaarani (2018), procedimentos de preparação da amostra (extração, purificação e pré-concentração), que corroborem com as vantagens das técnicas citadas, garantindo baixos limites de detecção (KAUR *et al.*, 2021). Nesse sentido, os procedimentos de extração convencionais ainda são largamente aplicados, mas os procedimentos baseados nos princípios da Química Verde têm ganhado cada vez mais espaço.

2.3.1 Procedimentos de extração convencionais

Segundo Kaur e colaboradores (2021), os procedimentos de extração mais comumente aplicados nas determinações de defensivos agrícolas incluem extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*), extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) e extração líquido-líquido dispersiva (DLLE, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Extraction*), principalmente devido à simplicidade e rapidez.

A extração em fase sólida fundamenta-se na adsorção dos analitos em sorventes sólidos, cuja escolha adequada é muito importante e depende da interação entre o sorvente e os analitos em si (SAMSIDAR, SIDDIQUEE e SHAARANI, 2018). Esse procedimento de extração é conveniente para defensivos agrícolas, como demonstram Farina e colaboradores (2017), que aplicaram SPE para extrair 15 pesticidas de diferentes classes em vários produtos vegetais, ao passo que Xie e colaboradores (2019) determinaram herbicidas em tomates.

O procedimento de extração líquido-líquido é, pela definição de Mitra (2003), uma extração em que as duas fases necessitam ser líquidas e imiscíveis entre si, sendo geralmente uma fase aquosa e outra orgânica. E, segundo Zhao e colaboradores (2019), a LLE é o principal procedimento usado para extração de defensivos agrícolas de matrizes majoritariamente apolares. A extração líquido-líquido dispersiva utiliza um solvente dispersor, que tem, entre suas funções, aumentar a solubilidade dos analitos-alvo na fase aquosa, acelerando o processo (WU X. *et al.*, 2017).

A DLLE, em escala macro ou micro, é predominantemente mais usada que a LLE pelo fato de requerer apenas uma etapa para atingir alta eficiência (DUARTE, DORES e VILLA, 2016). Ressalta-se que esses métodos têm, como principal desvantagem, a demanda de grandes volumes de solventes orgânicos, além da problemática relacionada ao descarte dos solventes pós-extração.

Entre os solventes mais utilizados para a extração de defensivos agrícolas estão: diclorometano, acetona, acetonitrila, acetato de etila, hexano (SAMSIDAR, SIDDIQUEE e SHAARANI, 2018), metanol e tolueno. Também é comum o uso de misturas de solventes para melhorar a recuperação dos métodos, além de agentes para neutralizar as matrizes, como hidróxido de sódio (NARENDERAN, MEYYANATHAN e BABU, 2020). A fase orgânica em qualquer tipo de extração geralmente é a fase que tem mais toxicidade para os analistas e meio ambiente, e por isso, não é adequado que, em uma análise com perspectivas também ambientais, seja adotado uma fase extratora com solventes tóxicos.

Kaur e colaboradores (2021) destacam que os procedimentos de extração clássicas não se adequam aos princípios da Química Verde, pois geralmente são demoradas e requerem grandes volumes de solventes orgânicos e não biodegradáveis, ressaltando a necessidade do desenvolvimento de novos

procedimentos, que não apenas sejam eficazes e sensíveis, mas também rápidos, econômicos, sustentáveis e ambientalmente seguros.

2.3.2 Procedimentos de extração verde

Stocka e colaboradores (2011) sinalizam que as etapas do processo analítico (coleta de amostra, preparação de amostra, separação e detecção) podem contribuir de diferentes formas para a poluição ambiental, mas o impacto ambiental das metodologias analíticas pode ser mitigado respeitando-se os princípios da Química Verde, que passam pela redução ou eliminação do uso ou geração de produtos, subprodutos, solventes ou reagentes perigosos para a saúde humana ou o meio ambiente.

Nesse sentido, De Marco e colaboradores (2019) tabelaram os princípios já publicados anteriormente sobre os parâmetros considerados para a adoção da Química Verde, por exemplo, minimizar e/ou evitar a geração de resíduos, a substituição de solventes tóxicos por solventes de baixa ou nenhuma toxicidade e menor consumo de energia elétrica. Os mesmos autores destacam, ainda, a economia financeira devido ao menor custo relacionado ao armazenamento e tratamento de efluentes.

Para Stocka e colaboradores (2011), o método de extração QuEChERS (sigla, em inglês, que designa um método rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro) para defensivos agrícolas está alinhado à Química Verde, pois requer consumo mínimo de amostra e solventes e pode ser modificado de acordo com o tipo de amostra e dos analitos. Samsidar, Siddiquee e Shaarani (2018) também pontuam como vantagens: adequação a análises multirresíduos, que permite a identificação e quantificação de múltiplos analitos simultaneamente em matrizes diversas; aplicabilidade a ampla variedade de analitos (pesticidas de diferentes polaridades e pH); e requer instrumentação simples. Biziuk e Stocka (2015) aplicaram o método QuEChERS para determinar resíduos de pesticidas em frutas e vegetais.

Numa perspectiva verde, os solventes orgânicos convencionais têm sido substituídos para a extração de defensivos agrícolas de diversas matrizes. Entre as aplicações de solventes verdes, Ravelo-Pérez e colaboradores (2009) utilizaram líquidos iônicos para a extração de pesticidas de bananas; Abolghasemi, Piryaee e Imani (2020) empregaram solventes eutéticos profundos na determinação de

pesticidas em vegetais e suco de frutas; e Ballesteros-Gómez, Sicilia e Rubio (2010) relataram a aplicabilidade de solventes supramoleculares na extração de defensivos agrícolas.

Quando a substituição dos solventes é inviável, a melhor alternativa é a miniaturização, apontam Stocka e colaboradores (2011), que ressaltam, ainda, que os procedimentos de microextração são baratos e minimizam a exposição a solventes tóxicos. Nesse sentido, a microextração líquido-líquido dispersiva foi adotada por Farajzadeh e colaboradores (2016) para a determinação de seis pesticidas organofosforados em suco de frutas e por Wu J. e colaboradores (2019) para a determinação de tetrametilpirazina em vinagre e a microextração de gota única foi empregada por Tsiropoulos e Amvrazi (2011) para a determinação de resíduos de defensivos agrícolas de várias classes em mel. Outra possibilidade de miniaturização é a microextração em fase sólida, que foi aplicada por Saraji, Jafari e Mossaddegh (2015) para a determinação de quatro pesticidas organofosforados em vegetais, frutas e água.

Na Tabela 1, são apresentados estudos que empregaram HPLC para análise de defensivos agrícolas, destacando-se a amplitude de detectores e procedimentos de preparo de amostras. Este levantamento evidencia que muitos trabalhos ainda empregam procedimentos convencionais para o preparo de amostras e fase móvel composta por solventes tóxicos, em desacordo com os princípios da Química Verde.

Ademais, podemos perceber que o tempo de corrida utilizado na cromatografia líquida de alta eficiência é proporcional, na maioria dos trabalhos, à quantidade de analitos estudados, mas não demonstra um gasto energético alto. No entanto, em todos os casos é possível perceber a permanência no uso de solventes tóxicos como fase móvel na corrida cromatográfica.

Tabela 1 – Determinação de defensivos agrícolas em diferentes matrizes por HPLC. (*continua*)

Matriz	n° de analitos	Fase estacionária	Detector	Fase móvel	Fluxo e Temperatura	Preparo de amostra	LD ⁽¹⁾	LQ ⁽²⁾	TC ⁽³⁾	Referência
Água	34	C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm)	UV ⁽⁴⁾ / MS ⁽⁵⁾	Metanol, ácido fórmico e água - Gradiente de eluição	0,5 mL min ⁻¹ 40 °C	Extração em fase sólida (acetona, acetato de etila, metanol, água e diclorometano)	5 - 30 ng L ⁻¹	17 - 99 ng L ⁻¹	50 min	Kapsi <i>et al.</i> , 2019
Suco de maçã	4	LiChrospher 60 RP-select B (125 mm x 4 mm, 5 µm)	DAD ⁽⁶⁾ (270 nm)	Acetonitrila/água 55/45 (v/v) - Isocrático	1 mL min ⁻¹ 25 °C	Extração em fase sólida (acetonitrila, água e fluxo de nitrogênio)	0,19 - 3,04 mg L ⁻¹	0,58 - 9,21 mg L ⁻¹	07 min	Velkoska-Markovska e Petanovska-Ilievskia, 2013
Água	6	H5-ODS C18 (15 cm x 4,6 mm, 5 µm)	UV (220 nm)	Metanol e água - Gradiente de eluição	1 mL min ⁻¹	Microextração em fase líquida e solvente eutético profundo	0,05 µg L ⁻¹	0,15 µg L ⁻¹	20 min	Pirsaheb e Fattahi, 2018
Leite de vaca	4	C18 (4,6 mm x 150 mm, 5 µm)	UV (235 nm)	Acetonitrila e água - Gradiente de eluição	1 mL min ⁻¹ 40 °C	Extração em ponto nuvem (Triton X-100, ácido acético, água, hidróxido de sódio e metanol)	10,95 µg L ⁻¹	36,5 µg L ⁻¹	32 min	Liu <i>et al.</i> , 2014
Ovos	13	C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	DAD (entre 220 e 360 nm)	0,02 mol L ⁻¹ acetato em pH 4,5 ± 0,02 e metanol/acetonitrila 50/50 (v/v) - Isocrático	1 mL min ⁻¹ 40 °C	Extração em fase sólida (ácido acético, clorofórmio, acetona e hexano)	0,30 - 1,35 µg kg ⁻¹	0,92 - 4,10 µg kg ⁻¹	45 min	Summa <i>et al.</i> , 2015

Legenda: (1) LD: limite de detecção; (2) LQ: limite de quantificação; (3) TC: Tempo de corrida cromatográfica; (4) UV: ultravioleta; (5) MS: espectrômetro de massa; (6) DAD: detector de arranjo de diodos.

Tabela 1 – Determinação de defensivos agrícolas em diferentes matrizes por HPLC. (*conclusão*)

Matriz	n° de analitos	Fase estacionária	Detector	Fase móvel	Fluxo e Temperatura	Preparo de amostra	LD ⁽¹⁾	LQ ⁽²⁾	TC ⁽³⁾	Referência
Trigo	3	VP-ODS (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)	UV-Vis ⁽⁷⁾ (254 nm)	Metanol/água 70/30 (v/v) - Isocrático	1 mL min ⁻¹	DLLME ⁽⁸⁾ (líquido iônico e metanol)	0,1 µg kg ⁻¹	-	15 min	Liu, Quan e Hu, 2018
Leite de vaca	1	C18 (125 x 3,5 µm) Pré coluna C18 (4 x 4,5 µm)	DAD ⁽⁶⁾ (224 nm)	Água/metanol 50/50 (v/v) - Isocrático	1 mL min ⁻¹	DSPE ⁽⁹⁾ (hexano, acetona, acetonitrila)	0,03 ng mL ⁻¹	0,39 ng L ⁻¹	10 min	Barchanska <i>et al.</i> , 2012
Leite de vaca	29	SB C18 (21 mm x 150 mm; 5 µm)	MS ⁽⁵⁾ (modo de ionização positiva e negativa)	Ácido fórmico 0,2% e metanol - Gradiente de eluição	0,2 mL min ⁻¹	Extração em fase sólida (Acetonitrila, Na ₂ SO ₄)	0,01x 10 ⁻³ - 4,8x 10 ⁻³ mg kg ⁻¹	0,03x10 ⁻³ - 14,5x10 ⁻³ mg kg ⁻¹	50 min	Tian, 2011
Leite de vaca	8	C18 (250 mm x 4,6 mm; 4 µm)	DAD (230 nm)	Acetonitrila e ácido Acético 0,01% - Gradiente de eluição	1 mL min ⁻¹	Extração em fase sólida (diclorometano, acetato de etila, acetonitrila e ácido acético)	0,002 - 0,004 mg kg ⁻¹	0,007 - 0,01 mg kg ⁻¹	23 min	Seccia <i>et al.</i> , 2011
Chá verde	102	C18 (100 mm x 2,1 mm; 1,8 µm)	MS	Acetonitrila e Ácido fórmico - Gradiente de eluição	0,3 mL min ⁻¹	QuEChERS (ácido acético, acetonitrila, MgSO ₄ , CH ₃ COONa)	0,03 - 15 µg kg ⁻¹	0,1 - 50 µg kg ⁻¹	42 min	Huang <i>et al.</i> , 2019

Legenda: (1) LD: limite de detecção; (2) LQ: limite de quantificação; (3) TC: Tempo de corrida cromatográfica; (5) MS: espectrômetro de massa; (6)

DAD: detector de arranjo de diodos; (7) UV-Vis: Ultravioleta-Visível; (8) DLLME: Microextração líquido-líquido dispersiva.

3 JUSTIFICATIVAS

O crescente e indiscriminado uso de defensivos agrícolas e, conseqüentemente, a contaminação dos alimentos, é objeto de estudo de muitos pesquisadores, pois esse uso tem sido alavancado pelo setor econômico e, principalmente, por liberações de emprego de defensivos agrícolas sem análises dos seus riscos reais de uso. As pesquisas têm desenvolvido diferentes métodos para avaliar a presença dessas substâncias em uma variedade de matrizes. Nesse sentido, considerando os artigos apresentados na Tabela 1, o presente trabalho propõe alternativas para minimizar os impactos ambientais associados às análises através de mudanças na composição da fase móvel para HPLC, ou utilização de solventes menos nocivos para a extração. Isso é fundamentado nos trabalhos que utilizaram solventes verdes, tal como líquidos iônicos e solventes eutéticos nos processos de preparo de amostra/extração.

Além dos procedimentos de extração é importante que sejam desenvolvidas técnicas de análises mais aprimoradas. Nesse sentido, métodos ecologicamente amigáveis são imprescindíveis, visto que também há a necessidade de rever as questões ambientais associadas às práticas analíticas.

No atual panorama em que vivemos, essa idealização de métodos *eco-friendly* tem levantado ideias acerca da substituição de solventes, redução de tempo de análise e miniaturização, esse último principalmente voltado para os procedimentos de extração. Nesse sentido, vem sendo estudado, amplamente, o uso de solventes de menor toxicidade ao ambiente e ao analista e, dessa maneira, solventes de menor toxicidade, como os do tipo eutético profundo ou iônico, que são frequentemente citados nos estudos mais recentes.

Nesse viés, é relevante a proposta do desenvolvimento de método cromatográfico para análise de defensivos agrícolas que atendam aos critérios da Química Verde, como apresentado neste trabalho, que substitui o metanol, fase móvel do método cromatográfico de referência, por um solvente menos agressivo ecologicamente, etanol 89%.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método de separação cromatográfica empregando um solvente verde, etanol 89%, para análise de oito defensivos agrícolas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar os fatores que influenciam a separação cromatográfica dos defensivos agrícolas: Aldicarbe, Ametrina, Atrazina, Bendiocarbe, Carbaril, Hexazinona, Metiocarbe e Metomil;
- Avaliar a qualidade da separação cromatográfica empregando os cálculos de Purnell;
- Validar o método desenvolvido para separação de oito defensivos agrícolas (inseticidas e herbicidas).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Para a fase móvel, empregada no método cromatográfico, foram utilizados etanol 89% (v/v) (grau HPLC, Honeywell Riedel-de Haën) e água ultrapura, obtida em sistema de purificação da Gehaka (Brasil), modelo Master P&D.

5.2 DESENVOLVIMENTOS DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

Para o desenvolvimento desse método cromatográfico foi necessário a utilização de dois cromatógrafos líquido de alta eficiência. Na otimização, foi utilizado o HPLC Shimadzu, LCsolutions, modelo DGU-20A5 Prominence, Japão, equipado com detector de arranjo de diodos-DAD (Shimadzu, modelo SPD-M20A Prominence, Japão). Na validação, foi utilizado o HPLC Shimadzu, LabSolutions, modelo LC-2030C 3D Plus Prominence, Japão, equipado com detector de arranjo de diodos-DAD (Shimadzu, modelo SPD-40V Prominence, Japão).

A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna Shim-pack CLC-C8(M) (5 μ m, 150 x 4,0 mm), utilizando como fluxo, a vazão de 1,0 mL min⁻¹, 39 °C de temperatura do forno e uma mistura de solventes como fase móvel: Etanol 89% (v/v):água, em gradiente de eluição.

Para avaliar os diferentes fatores, que podem afetar uma separação cromatográfica, tais quais gradiente de eluição da fase móvel, fluxo e temperatura do forno, foram realizados diversos estudos univariados, de modo a atingir as melhores condições do método.

5.3 PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO

A avaliação de uma separação cromatográfica é feita a partir da verificação de uma série de parâmetros que irão permitir, segundo Azevedo e colaboradores (2019), a determinação do desempenho cromatográfico e a otimização do processo de separação.

5.3.1 Tempo de retenção (t_r)

Para Collins, Braga e Bonato (2006) considera-se o tempo de retenção de um analito, o tempo que o componente da amostra passou na coluna da sua injeção até a sua saída, ou seja, a eluição dentro de um sistema cromatográfico, registrado no cromatograma.

5.3.2 Número de pratos teóricos (N)

Originalmente o termo “prato teórico” tinha como finalidade expressar, em um processo de contato líquido-vapor, a eficiência dessa separação (LANÇAS, 2009). A partir do número de pratos teóricos (N), podemos dizer que quanto maior o for, maior é a eficiência da coluna e melhor a separação cromatográfica.

Para o cálculo de N, utiliza-se a seguinte equação:

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{W_b} \right)^2 \quad (\text{Equação 01})$$

Onde t_r é o tempo de retenção e w_b é a largura da base do pico.

5.3.3 Fator de retenção (k)

De acordo com Lanças (2009), esse parâmetro também pode ser denominado de relação de partição ou de distribuição.

Para o cálculo de k, utiliza-se a seguinte equação:

$$k = \frac{t_r - t_m}{t_m} = \frac{t'_r}{t_m} \quad (\text{Equação 02})$$

Onde, t_m é o tempo morto, referente ao tempo que a fase móvel leva para percorrer a fase estacionária por completo.

5.3.4 Fator de separação (α)

O fator de separação pode também ser denominado de retenção relativa (LANÇAS, 2009), ou seletividade. Ainda para esse autor, este parâmetro é a relação existente entre o tempo em que dois solutos passam na fase estacionária, ou seja, o tempo de retenção de dois analitos. Esse fator pode também ser entendido como medidor da seletividade do método cromatográfico.

Para o cálculo de α , utiliza-se a seguinte equação:

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}} \quad (\text{Equação 03})$$

5.3.5 Resolução (R_s)

Para Collins, Braga e Bonato (2006), a resolução avalia quantitativamente a separação de dois picos consecutivos a partir da distância entre eles. Esse parâmetro é calculado a partir da equação de Purnell (equação 04) e indica a habilidade da coluna em separar dois analitos.

Para o cálculo de R_s , utiliza-se a seguinte equação:

$$R_s = 2 \frac{(t_{r2} - t_{r1})}{(W_{b1} + W_{b2})} \quad (\text{Equação 04})$$

Onde, t_{r1} e t_{r2} são os tempos de retenção de dois picos consecutivos, e W_{b1} e W_{b2} representam a largura da base dos picos.

5.3.6 Altura dos pratos teóricos (H)

A altura dos pratos teóricos é um parâmetro que deve ser analisado em conjunto a N , pois, considerando um valor fixo de L (comprimento da coluna cromatográfica, em milímetros), valores pequenos de H estão associados a valores elevados de N (COLLINS, BRAGA e BONATO 2006; LANÇAS 2009). Em última análise, isto representa picos cromatográficos com pouco alargamento da base, ou

seja, separação cromatográfica com resolução adequada e eficiente (SKOOK *et al.* 2006).

Para o cálculo de H, utiliza-se a seguinte equação:

$$H = \frac{L}{N} \quad (\text{Equação 05})$$

5.4 OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV DOS COMPOSTOS ESTUDADOS

Para identificar os analitos estudados, foram efetuadas injeções de soluções dos padrões de referência e de misturas dos analitos e, por comparação, foram identificados os picos através dos seus tempos de retenção apresentados nos cromatogramas, semelhança na apresentação dos picos e comparação dos espectros de absorção na região do UV.

5.5 MÉTRICAS DE AVALIAÇÃO PARA MÉTODO VERDE

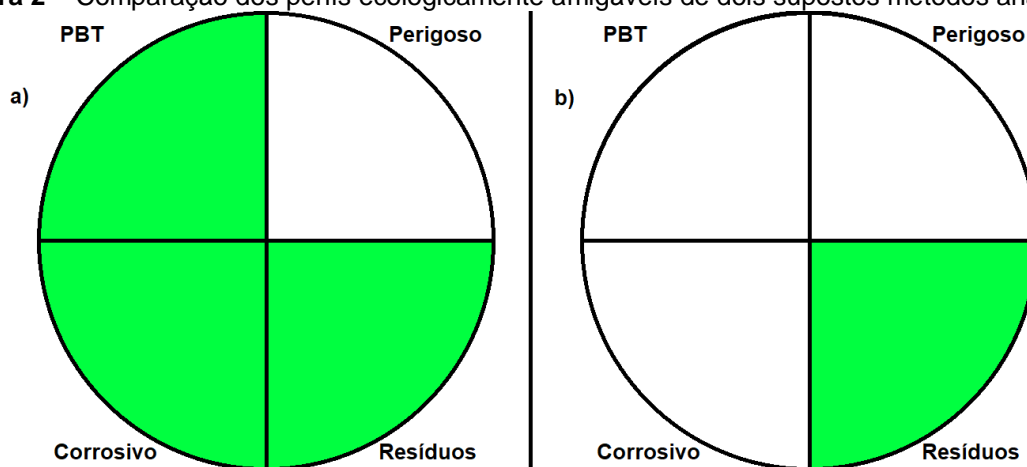
Devido ao crescimento da proposta de desenvolvimento de métodos verdes e análises apenas qualitativas ou baseadas em um único parâmetro, como toxicidade de reagentes, volume de solventes ou consumo de energia, algumas ferramentas vêm sendo utilizadas para determinar o teor de verde constante em um método que se propõe a essa aplicação. A mais antiga ferramenta utilizada nessa avaliação é o Índice Nacional de Métodos Ambientais – NEMI (PŁOTKA-WASYLKA, 2018), que através de símbolos e cores, em um pictograma, permite indicar o quanto o método é ecologicamente amigável.

Para Płotka-Wasyłka (2018), essa avaliação através do símbolo NEMI é apenas qualitativa, mas tem como vantagem a facilidade na leitura e entendimento do critério verde do método apresentado. O banco de dados NEMI baseia-se em critérios acerca dos reagentes e resíduos associados ao método analítico, tais quais se os reagentes são PBT - persistentes, bioacumuláveis ou tóxicos; perigosos - ou seja, se não estão inclusos na listagem de Inventário de liberação de tóxicos (TRI) do EPA U.S. (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) – lista com produtos que

causam câncer ou outro efeito crônico à saúde humana ou efeitos adversos significativos à saúde humana ou ao ambiente (EPA, 2021b); corrosivos (pH < 2 ou > 12) e; se são gerados mais que 50 g de resíduos (GAŁUSZKA *et al.*, 2012).

Em todas essas situações, caso o reagente ou resíduo se enquadre nesses critérios não verdes, o pictograma não será colorido na escala verde e, portanto, visualmente será perceptível que o método não apresenta características ecologicamente amigáveis (Figura 2).

Figura 2 – Comparação dos perfis ecologicamente amigáveis de dois supostos métodos analíticos.



Fonte: Autor (2021). a) pictograma NEMI de um método de alto teor verde e; b) pictograma NEMI de um método pouco teor verde.

Além do pictograma NEMI, outra ferramenta que vem crescendo em aplicação para consideração de métodos verdes, ou não, é a Eco-escala. Uma escala com pontuação de penalidades (tabela 2) que são subtraídas de 100 e que quanto mais próxima for a avaliação do limite máximo, mais verde e econômico é o método analítico (PŁOTKA-WASYLKA, 2018; TOBISZEWSKI, 2016).

Na tabela 2, são apresentados os pontos de penalidade atribuídos aos métodos quando os parâmetros avaliados desviam da idealidade do método verde. Após serem feitas as considerações, são efetuados os cálculos de acordo com a equação 06 para que seja conhecido o valor da escala verde do método estudado.

$$\text{Eco-escala analítica} = 100 - \text{total de pontos de penalidade} \quad (\text{Equação 06})$$

Tabela 2 – Pontos de penalidade (PPs) para eco-escala analítica.

		Reagentes	
		PP subtotal	PP total
Quantidade	< 10 mL (g)	1	Quantidade PP
	10 –100 mL (g)	2	
	> 100 mL (g)	3	
Perigo (físico, ambiental, de saúde)	Nenhum	0	Perigo PP
	Risco menos grave	1	
	Risco mais grave	2	
		Instrumentos	
Energia	≤ 0,1 kWh por amostra		0
	≤ 1,5 kWh por amostra		1
	> 1,5 kWh por amostra		2
Risco Ocupacional	Hermetização do processo analítico		0
	Emissão de vapores e gases		3
Desperdício	Nenhum		0
	< 1 mL (g)		1
	1 – 10 mL (g)		3
	> 10 mL (g)		5
	Reciclando		0
	Degradação		1
	Passivação		2
Sem tratamento		3	

Fonte: Adaptado de GAŁUSZKA, A. *et al.* (2012).

Para Galuszka e colaboradores (2012), a eco-escala atinge três faixas: > 75 pontos para uma excelente análise verde; > 50 pontos para uma análise verde aceitável e; < 50 pontos para uma análise verde inadequada. Ainda, para a pontuação de penalidades da eco-escala, é necessário destacar as instruções acerca do gasto energético por instrumentos e práticas de laboratório, onde FTIR e titulação consomem menos que 0,1 kWh por amostra, CG e CLAE consomem menos que 1,5 kWh por amostra e; RMN e cromatógrafos associados à espectrometria de massas consomem mais que 1,5 kWh por amostra.

5.6 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS

Para a validação de métodos analíticos, algumas figuras de mérito foram estudadas, sendo as avaliadas nesse trabalho: ajuste da curva analítica, faixa de linearidade, precisão inter e intradia, exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). Ribeiro e colaboradores (2008) sinalizam que o indicativo do bom

desempenho das técnicas é dado pela estimativa quantitativa dessas figuras de mérito, dados esses que são obtidos através de uma sequência numerosa de experimentos e cálculos estatísticos.

Esses cálculos estatísticos foram realizados com o auxílio da ferramenta desenvolvida por Ribeiro e colaboradores (2008), uma planilha de validação automática desenvolvida no Microsoft Excel, necessitando apenas que o usuário introduza informações do sinal analítico e concentração das espécies. A planilha fornece alguns dos resultados necessários para que sejam avaliadas e discutidas as figuras de mérito que direcionam a validação dos métodos.

5.7 SOFTWARES UTILIZADOS NO TRATAMENTO DOS DADOS

Para a obtenção dos dados cromatográficos foi utilizado os *softwares* LabSolutions e LCSolution, dos próprios equipamentos de HPLC e para o tratamento desses dados, os programas Statistica® 7 e Microsoft Excel®.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

O método cromatográfico foi desenvolvido utilizando como método de referência, o descrito por De Llasera e Bernal-González (2001), que utilizou HPLC-DAD/RF, e gradiente contendo água e metanol como fase móvel, em uma coluna C18 (5 μm , 150 x 4,6 mm) com injeção de 20 μL a 37 °C e vazão a 1,0 mL min^{-1} , para determinação de pesticidas carbamatos.

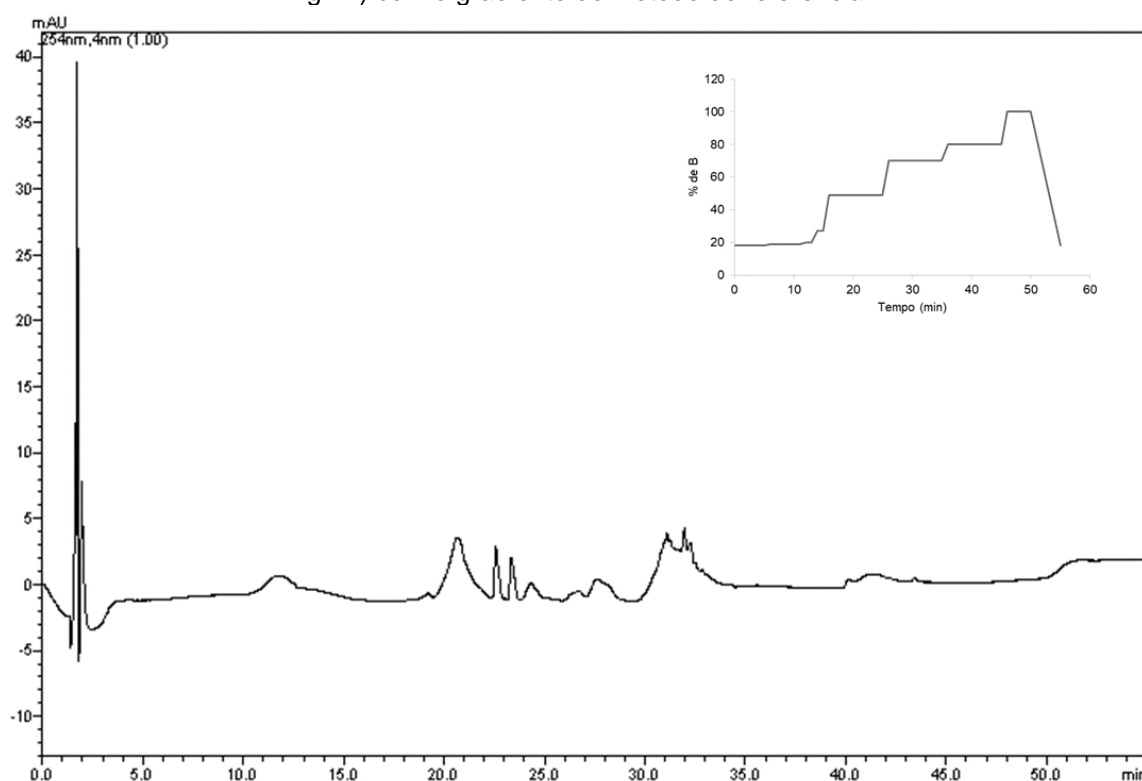
A escolha desse artigo como referência ocorreu devido a sete, dos quatorze analitos inicialmente propostos, serem comuns ao apresentado pelos autores e por esta pesquisa. No entanto, o diferencial proposto foi a adoção de método *eco-friendly*, como são chamados os métodos ecologicamente amigáveis e que é descrito por Jahangirian (2017), que cita os principais objetivos propostos por esses métodos, como: o uso de materiais e fontes de energia renováveis, o uso de solventes ou reagentes seguros e a prevenção da produção de resíduos. Deste modo, o método de partida teve como principal alteração para os nossos estudos, a substituição da fase móvel do metanol para o etanol 89% (v/v), solvente este com toxicidade bem menor que o metanol, corroborando com o proposto por Oliveira (2021), no sentido de afirmar que métodos *eco-friendly* visam menor impacto ao ecossistema mediante consumo menor de solventes com elevada toxicidade.

Além da escolha de solventes de menor toxicidade e em quantidade menor, outro fator que pode ser considerado *eco-friendly* é o tempo de análise, visto que há um menor gasto de energia elétrica dos equipamentos e corrobora também com o proposto pela frequência analítica idealizada com menor tempo para uma análise. Assim, a coluna adotada neste trabalho é também do tipo fase reversa, no entanto, apresenta composição diferente à do método de referência e, como consequência, pôde-se obter com uma coluna C8 com tempos de retenção menores para os analitos, quando comparada à coluna C18 (octadecil). Esta diminuição do tempo de retenção deve-se à menor interação dos compostos apolares com o substituinte presente na coluna C8 (octil), que possui menor caráter apolar que o constituinte da coluna C18.

Nos testes iniciais com a coluna C8, utilizando esse método de referência, ocorreu um aumento de pressão e presença de ruídos na linha de base,

principalmente a partir dos 25 minutos, dificultando a identificação de picos reais (Figura 3). Com relação ao aumento da pressão e indefinição dos picos, analisamos visualmente o cromatograma e foi observado o tempo em que ocorria a aparição dos picos. Ao comparar esse tempo com o gradiente de eluição proposto no método de referência, foi verificada a inviabilidade em utilizar gradientes com valores superiores a 50% de etanol 89% (v/v), principalmente, com elevação dessa proporção em curto intervalo de tempo, pois, os sinais apresentavam-se como ruídos (Figura 3).

Figura 3 – Cromatograma resultante da mistura de padrões de quatorze defensivos agrícolas (1,00 mg L⁻¹) com o gradiente do método de referência.

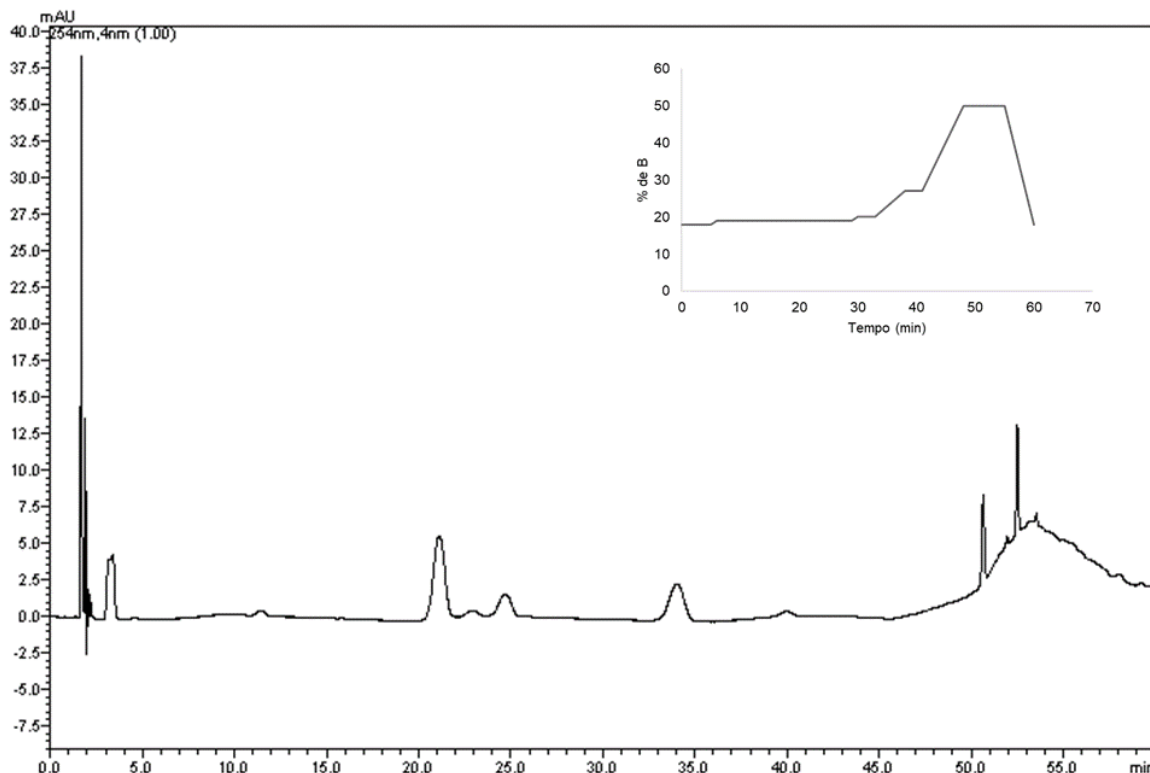


Fonte: Autor (2020). Cromatograma obtido em 254 nm sob as seguintes condições cromatográficas: Solvente A (água) e B (Etanol 89%, v/v), em gradiente linear de eluição: 0-5 min: 18% (v/v) de B em A; 6-11 min: 19% (v/v) de B em A; 12-13 min: 20% (v/v) de B em A; 14-15 min: 27% (v/v) de B em A; 16-25 min: 49% (v/v) de B em A; 26-35 min: 70% (v/v) de B em A; 36-45 min: 80% (v/v) de B em A; 46-50 min: 49% (v/v) de B em A com redução a 18% (v/v) até 55 min a 37 °C e 1,0 mL min⁻¹.

Desse modo, a primeira adaptação do método de referência foi no aumento do tempo para a elevação da composição da fase móvel, atingindo o máximo de 50% (v/v) da fase B e com *steps* menos íngremes. Esta ponderação na limitação de etanol em 50% ocorreu, também, devido à verificação feita por Furusawa (2004), o qual desenvolveu um método analítico para separar defensivos agrícolas, utilizando uma

fase móvel isocrática de água/etanol 50% (v/v). Assim, com esta alteração, obtivemos o primeiro cromatograma que possibilitou a visualização da separação de analitos, como apresentado na figura 4.

Figura 4 – Cromatograma resultante da mistura de padrões de quatorze defensivos agrícolas (1,00 mg L⁻¹) com o gradiente do primeiro método adaptado.



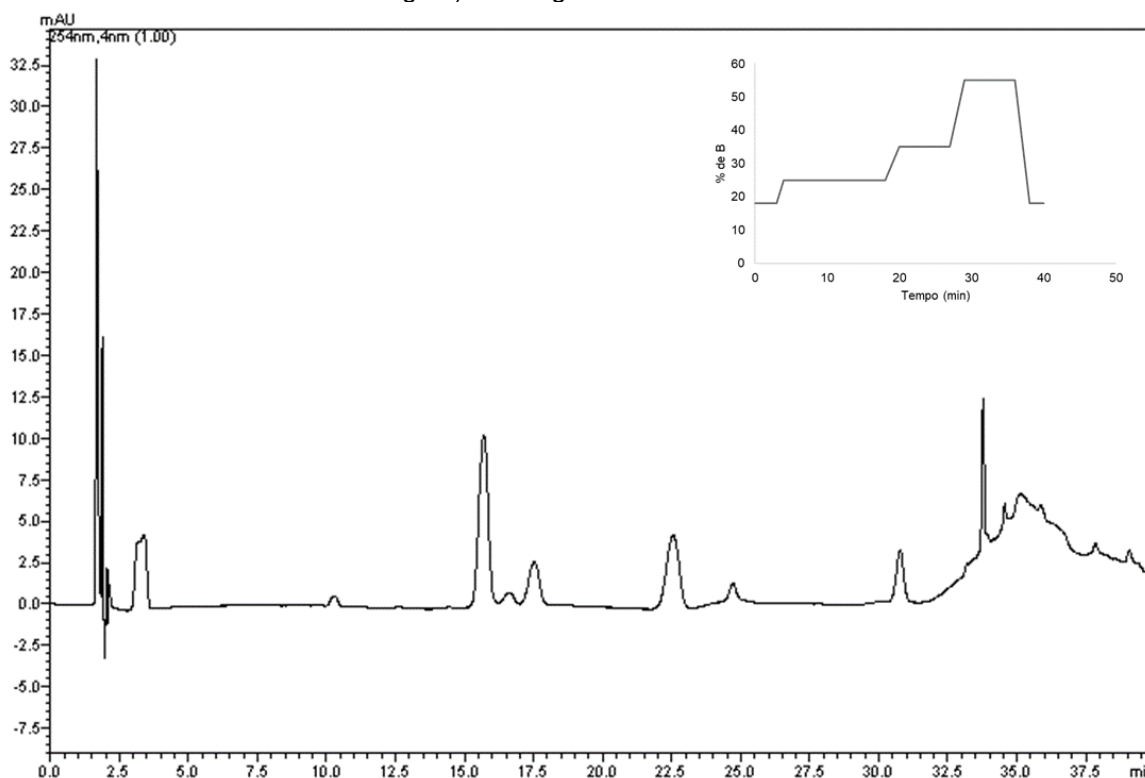
Fonte: Autor (2020). Cromatograma obtido em 254 nm sob as seguintes condições cromatográficas: Solvente A (água) e B (Etanol 89%, v/v), em gradiente linear de eluição: 0-5 min: 18% (v/v) de B em A; 6-29 min: 19% (v/v) de B em A; 30-33 min: 20% (v/v) de B em A; 38-41 min: 27% (v/v) de B em A; 48-55 min: 50% (v/v) de B em A com redução a 18% (v/v) até 60 min a 37 °C e 1,0 mL min⁻¹.

A partir desse primeiro cromatograma, foram realizados diversos ensaios de modo a otimizar a separação, com relação à qualidade e ao tempo de análise, que, por consequência, nos leva à consideração de menor gasto energético e de reagentes. A primeira variável estudada foi a fase móvel, no modo de gradiente de eluição, permitindo o aumento da força da fase móvel e, portanto, variando a interação da fase estacionária com os analitos (CASS e DEGANI, 2011) devido à alteração na solubilidade dos componentes na fase móvel (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

No estudo do gradiente de eluição, foram feitas dezoito alterações do método, com modificações apenas na proporção da composição da fase móvel e tempo de manutenção dessas proporções. Após essas modificações foi possível obter a

separação de oito analitos com picos bem definidos, conforme visualizado na figura 5. Esse gradiente otimizado permitiu que, além da separação visual dos picos, fossem obtidos, também, valores de resolução dos picos mais adequados (superiores a 1,5) para um bom método cromatográfico, como proposto por Collins, Braga e Bonato (2006).

Figura 5 – Cromatograma resultante da mistura de padrões de quatorze defensivos agrícolas ($1,00 \text{ mg L}^{-1}$) com o gradiente otimizado.



Fonte: Autor (2020). Cromatograma obtido em 254 nm sob as seguintes condições cromatográficas: Solvente A (água) e B (Etanol 89%, v/v), em gradiente linear de eluição: 0-3 min: 18% (v/v) de B em A; 4-18 min: 25% (v/v) de B em A; 20-27 min: 35% (v/v) de B em A; 29-36 min: 55% (v/v) de B em A; 38-40 min: 18% (v/v) de B em A a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

Após a definição do gradiente ótimo de eluição (figura 5), os parâmetros para a avaliação da qualidade da separação cromatográfica, a partir da otimização do gradiente, foram calculados. Esses parâmetros estão relacionados nas tabelas 3 e 4, de modo a comparar com os parâmetros obtidos como o primeiro método adaptado (figura 4).

Tabela 3 – Parâmetros de avaliação da separação cromatográfica com o primeiro método adaptado.

Analito	T_R	W_b	k	α	N	R_s
Metomil	3,37	0,79	0,51	5,73	291,85	10,11
Aldicarbe	11,46	0,81	0,85	2,12	3204,96	7,79
Hexazinona	22,39	2,00	0,93	1,10	2011,82	1,31
Carbofurano	24,46	1,17	0,93	1,09	6947,09	1,49
Bendiocarbe	26,54	1,62	0,94	1,41	4283,71	5,61
Carbaril	36,86	2,06	0,95	1,14	5122,95	3,26
Atrazina	41,87	1,01	0,96	1,22	27331,63	12,14
Ametrina	50,86	0,47	0,97	1,22*	188174,67	12,14*

Onde, Tr = tempo de retenção do pico; Wb = largura da base do pico; k = fator de retenção; α = fator de separação; N = número de pratos teóricos e Rs = resolução. * Valores do pico anterior.

Tabela 4 – Parâmetros de avaliação da separação cromatográfica do método com gradiente otimizado.

Analito	T_R	W_b	k	α	N	R_s
Metomil	3,40	0,89	0,51	5,02	235,87	9,68
Aldicarbe	10,32	0,55	0,84	1,62	5737,02	6,67
Hexazinona	15,69	1,07	0,89	1,07	3472,25	1,04
Carbofurano	16,60	0,69	0,90	1,06	9180,57	1,11
Bendiocarbe	17,52	0,97	0,90	1,32	5220,29	4,49
Carbaril	22,54	1,27	0,93	1,10	5057,59	2,24
Atrazina	24,72	0,67	0,93	1,26	21586,73	7,92
Ametrina	30,77	0,85	0,95	1,26*	20813,05	7,92*

Onde, Tr = tempo de retenção do pico; Wb = largura da base do pico; k = fator de retenção; α = fator de separação; N = número de pratos teóricos e Rs = resolução. * Valores do pico anterior.

Além dos valores dispostos nas tabelas 3 e 4, também foram calculados o número de pratos teóricos médio (\bar{N}) e o desvio padrão (s) associado. Para o primeiro método adaptado obtivemos $\bar{N} = 29.671,08$ e $s = 64.609,82$. A partir do \bar{N} calcula-se a altura dos pratos teóricos, $H = 0,000506$ cm. Já para o método com os parâmetros cromatográficos otimizados, temos $\bar{N} = 8.912,92$; $s = 7.980,22$ e $H = 0,00168$ cm.

Considerando os parâmetros avaliados, é esperado para uma separação eficiente, que os valores de fator de retenção (k) estejam entre 0,5 e 20 (Collins, Braga e Bonato, 2006), o que foi observado para todos os analitos, sendo que quanto

maiores, melhor a resolução da separação cromatográfica. Nos casos acima, não houve uma alteração significativa nesse parâmetro quando comparados os dois métodos. Ainda para Collins, Braga e Bonato (2006), é esperado que o fator de separação (α) seja ≥ 1 , o que representa uma boa seletividade e retenção do método, parâmetro verificado em ambos os casos e; para o número de pratos teóricos (N), é esperado valores maiores que 2000, o que foi verificado para praticamente todos os analitos, sendo a exceção o pico do metomil que pode estar relacionado à sua saída muito próxima ao pico do solvente (não retido em aproximadamente 1,7 min).

Quanto à resolução (R_s), Skoog e colaboradores (2006) definem que valores até 1, são indicativos que está existindo uma coeluição total ou parcial dos picos adjacentes e quanto maiores forem os valores de R_s , mais bem resolvidos estão os picos no cromatograma, geralmente associado a valores maiores que 1,5 e segundo a IUPAC o ideal é atingido com resolução > 2 , o que não foi verificado apenas com os picos 3 e 4, devido aos seus tempos de retenção serem muito próximos. Referente à altura dos pratos teóricos (H), é possível dizer que há melhores separações quanto menores forem os valores desse parâmetro.

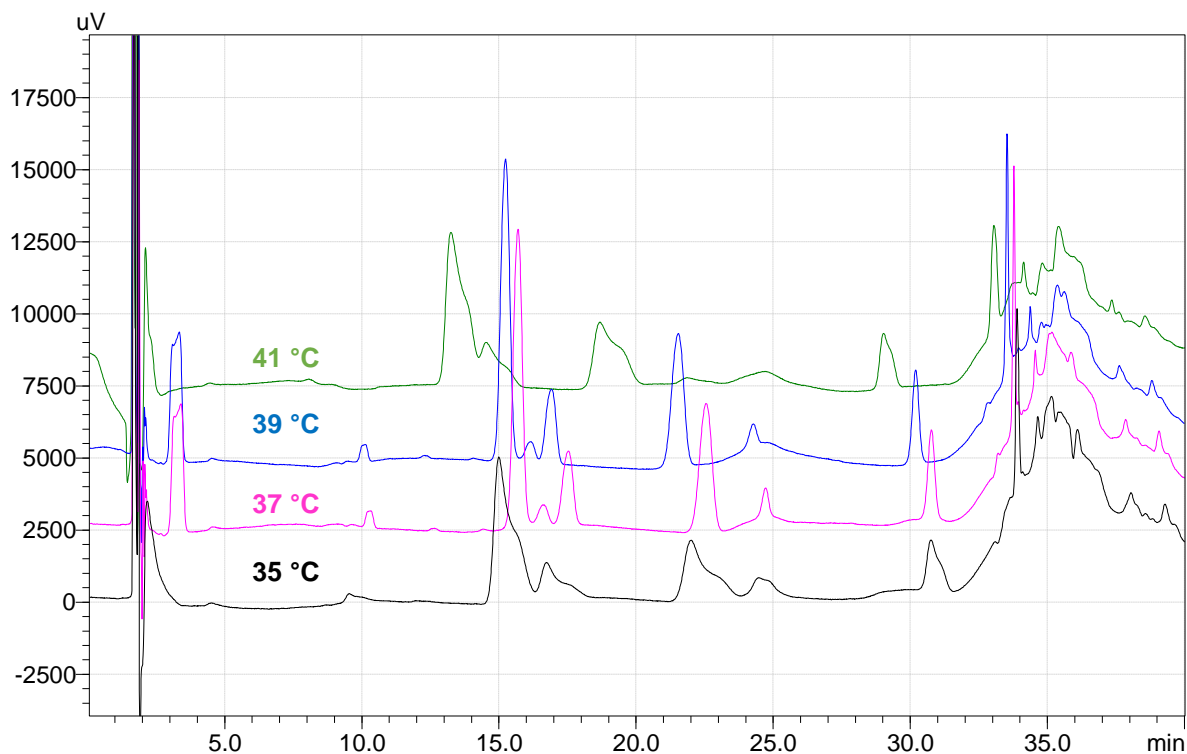
Dessa forma, podemos afirmar que, de maneira geral há uma melhoria do método ao compararmos os valores obtidos com o primeiro método (tabela 3) e os valores dos parâmetros com o gradiente otimizado no HPLC antigo (tabela 4). Essa melhoria é mais relevante quando analisamos o tempo de análise que foi diminuído em 20 minutos e os seus parâmetros para a consideração de uma boa separação cromatográfica foram mantidos.

Com o gradiente ótimo definido, ainda se fazia necessário estudar outras variáveis que influenciam no método cromatográfico e, a partir do gradiente selecionado, a temperatura do forno foi avaliada. Para isso, foi realizada a variação em quatro níveis para determinação da temperatura que permitisse melhores separações dos picos no método cromatográfica (Figura 6).

Dessa forma, o melhor cromatograma obtido foi com o sistema a 39 °C devido à antecipação dos picos, quando comparado à temperatura de 37 °C utilizada inicialmente, o que permite o encerramento da análise com menor tempo aumentando a frequência analítica e reduzindo consumo de reagente e energia elétrica. Ao mesmo tempo, temperaturas mais baixas e mais elevadas proporcionaram a coeluição dos picos de alguns analitos, logo percebemos que um ensaio em temperaturas abaixo de

35 °C ou acima de 41 °C não teria viabilidade para o método. Além disso, o uso de temperaturas mais elevadas fere o princípio da Química Verde gerando resíduos com temperaturas acima da temperatura ambiente (GAŁUSZKA, A. *et al.* 2012), além do risco de poder ocasionar aumento da pressão máxima no sistema (BORGES, BOTTOLI e COLLINS, 2010), causando danos ao equipamento.

Figura 6 – Cromatogramas obtidos em diferentes temperaturas.

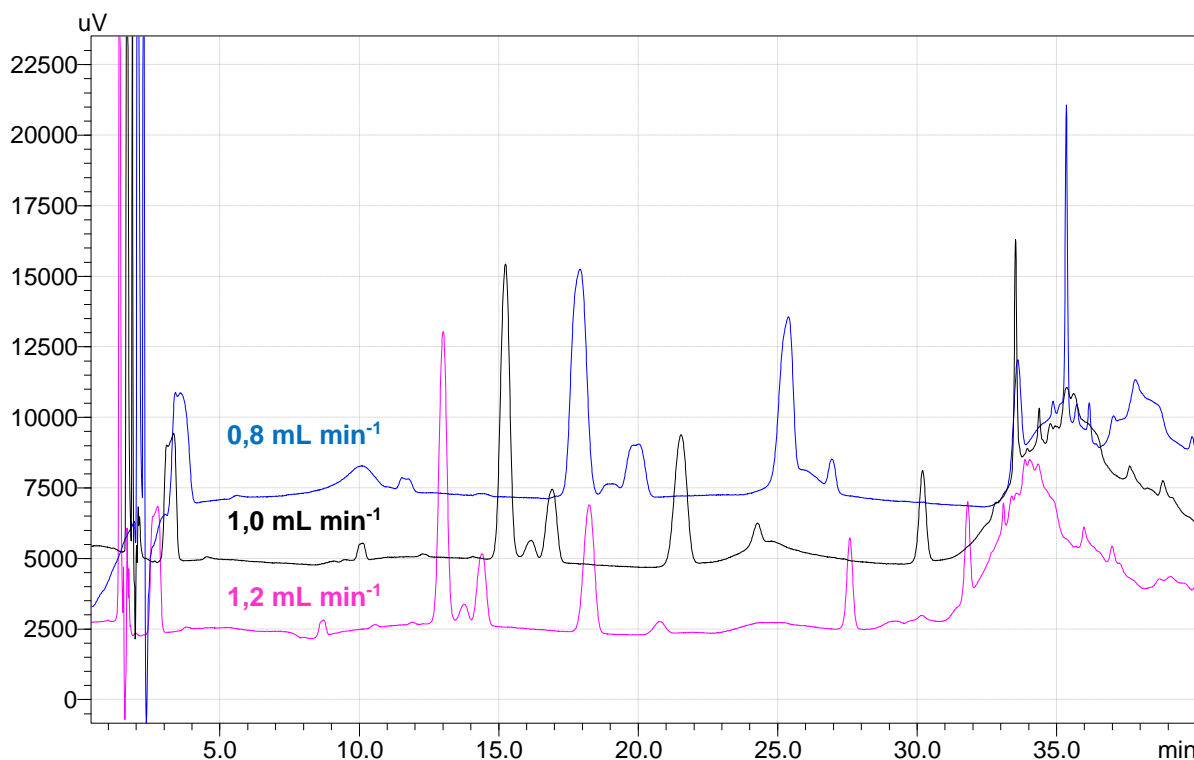


Fonte: Autor (2020). Injeção de mistura de padrões de quatorze defensivos agrícolas ($1,00 \text{ mg L}^{-1}$) com o gradiente otimizado usando HPLC/DAD. Fluxo: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

Com o gradiente de eluição e temperatura definidos, o último parâmetro estudado foi o fluxo da fase móvel. Para isso, além do fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ foram propostos para a avaliação outros quatro níveis de fluxo, sendo os selecionados: 0,8; 1,2; 1,4 e; $1,6 \text{ mL min}^{-1}$.

Ao analisarmos visualmente a figura 7 com os cromatogramas obtidos em três vazões diferentes, verificamos que o fluxo mais baixo, $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, que o trabalhado inicialmente, $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ causou alargamento das bases dos picos, com leve coeluição da base dos picos de alguns analitos, atraso no tempo de retenção e diminuição da resolução do método cromatográfico, por isso o fluxo de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ foi descartado para utilização.

Figura 7 – Cromatogramas obtidos em diferentes fluxos de vazão da fase móvel.



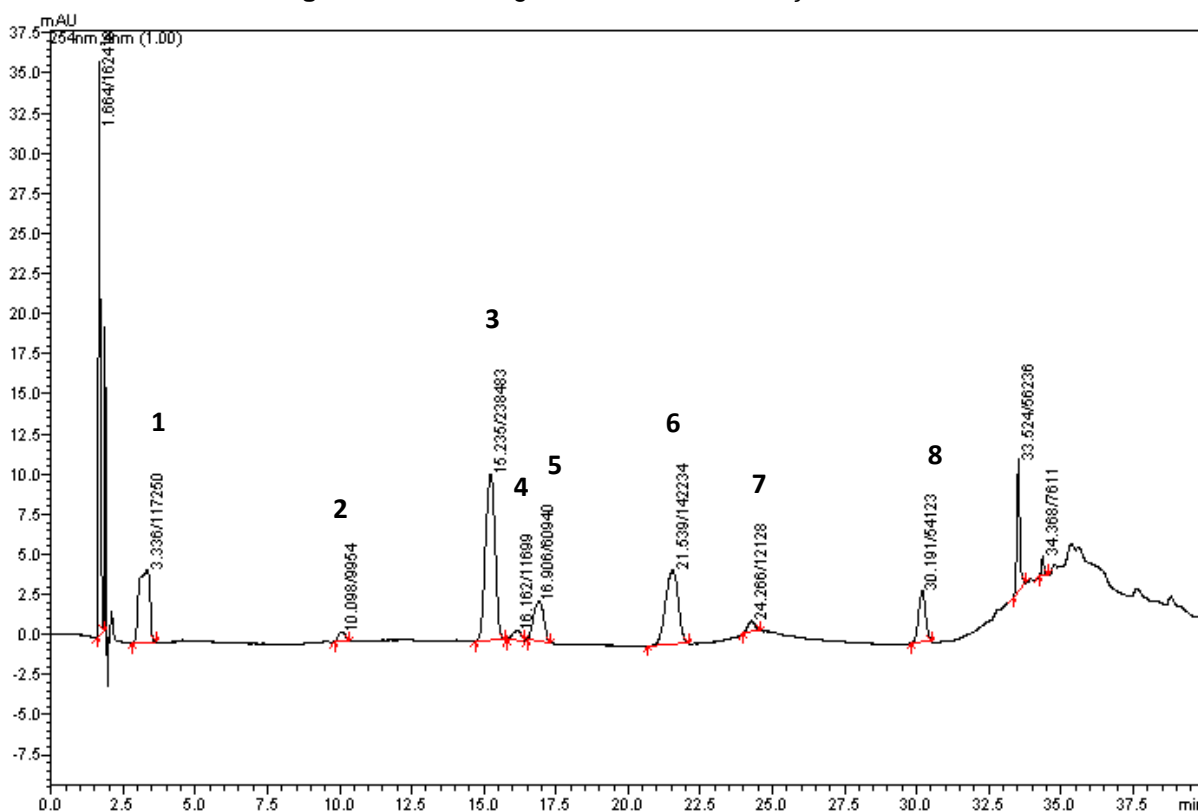
Fonte: Autor (2020). Injeção de mistura de padrões de quatorze defensivos agrícolas ($1,00 \text{ mg L}^{-1}$) com o gradiente otimizado usando HPLC/DAD. Temperatura: $39 \text{ }^\circ\text{C}$.

Apesar de o fluxo de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ ter antecipado os picos, houve uma elevação da pressão que atingiu 220 kgf/cm^2 , o que poderia causar prejuízos à coluna e ao equipamento, sendo por esse motivo descartado. Desta forma, o fluxo de vazão da fase móvel de trabalho foi mantido em $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

Partindo dessa análise, não foram realizados os testes inicialmente propostos para os fluxos de $1,4$ e $1,6 \text{ mL min}^{-1}$, visto que era esperado pressões muito mais elevadas que a obtida com o fluxo de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$.

Após definição das condições ótimas para o método cromatográfico, foram realizadas injeções individuais de soluções padrões dos analitos em concentração igual à da mistura injetada no desenvolvimento do método. A partir disso, foi feita a comparação das formas dos picos e tempos de retenção obtidos nas análises para correlação entre analito, tempo de retenção e pico apresentado no cromatograma. Ademais, é possível visualizar a existência de sinais após os 33 minutos de corrida, que podem estar associados a ruídos, interação do solvente ou algum analito que não foi bem separado ou seus derivados.

Figura 8 – Cromatograma obtido sob condições ótimas.

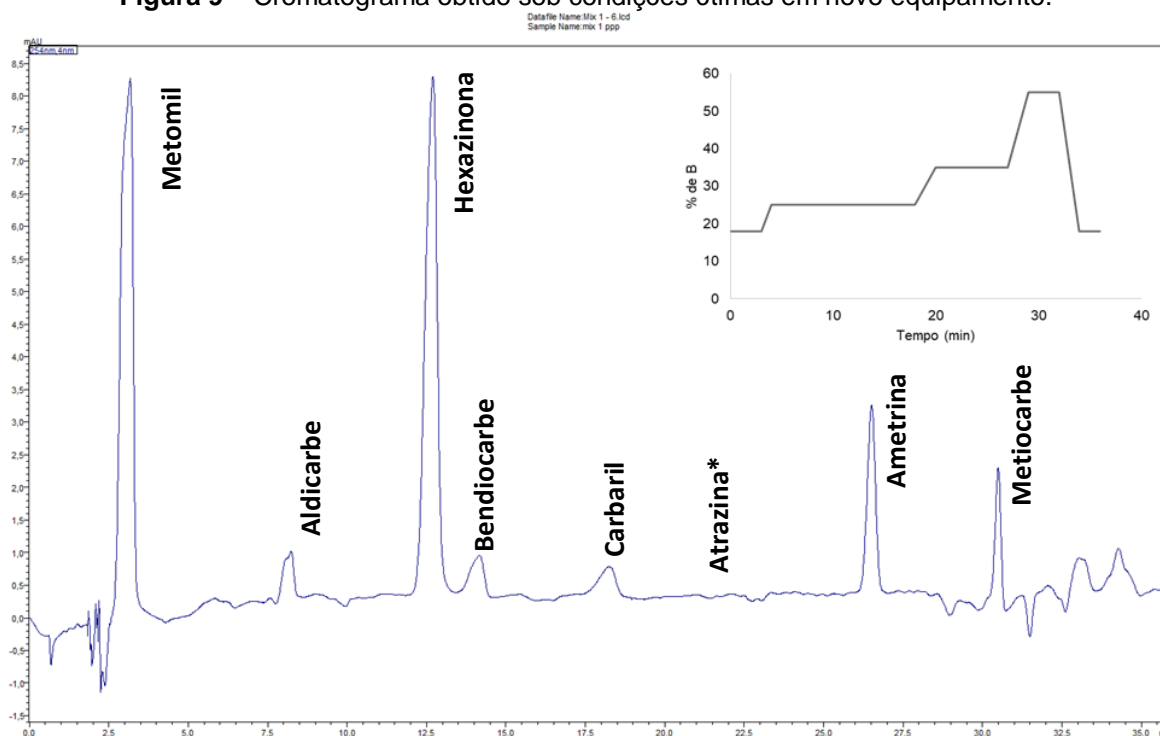


Fonte: Autor (2020). Injeção de mistura de padrões de quatorze defensivos agrícolas ($1,00 \text{ mg L}^{-1}$) com o gradiente otimizado usando HPLC/DAD em 254 nm, a $39 \text{ }^\circ\text{C}$ e fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. 1) Metomil; 2) Aldicarbe; 3) Hexazinona; 4) Carbofurano; 5) Bendiocarbe; 6) Carbaril; 7) Atrazina; 8) Ametrina.

Após a definição do gradiente, temperatura, fluxo e identificação dos analitos individualmente, o método de separação cromatográfica estava definido, no entanto, houve a necessidade de mudança de equipamento, pois o primeiro apresentou problemas, mantendo-se as condições otimizadas. Devido à existência de algumas variações na tecnologia dos instrumentos foi possível reduzir o tempo de análise para a separação de oito analitos, como apresentado na figura 9, com pequena alteração no gradiente de eluição.

Essa mudança possibilitou a inclusão do defensivo agrícola metiocarbe, que no equipamento anterior não era visualizado em nenhum comprimento de onda analisado, no entanto a separação do carbofurano foi comprometida devido a coeluição do pico. Dessa forma, a separação cromatográfica foi mantida para oito analitos, mesmo com a alteração de instrumento.

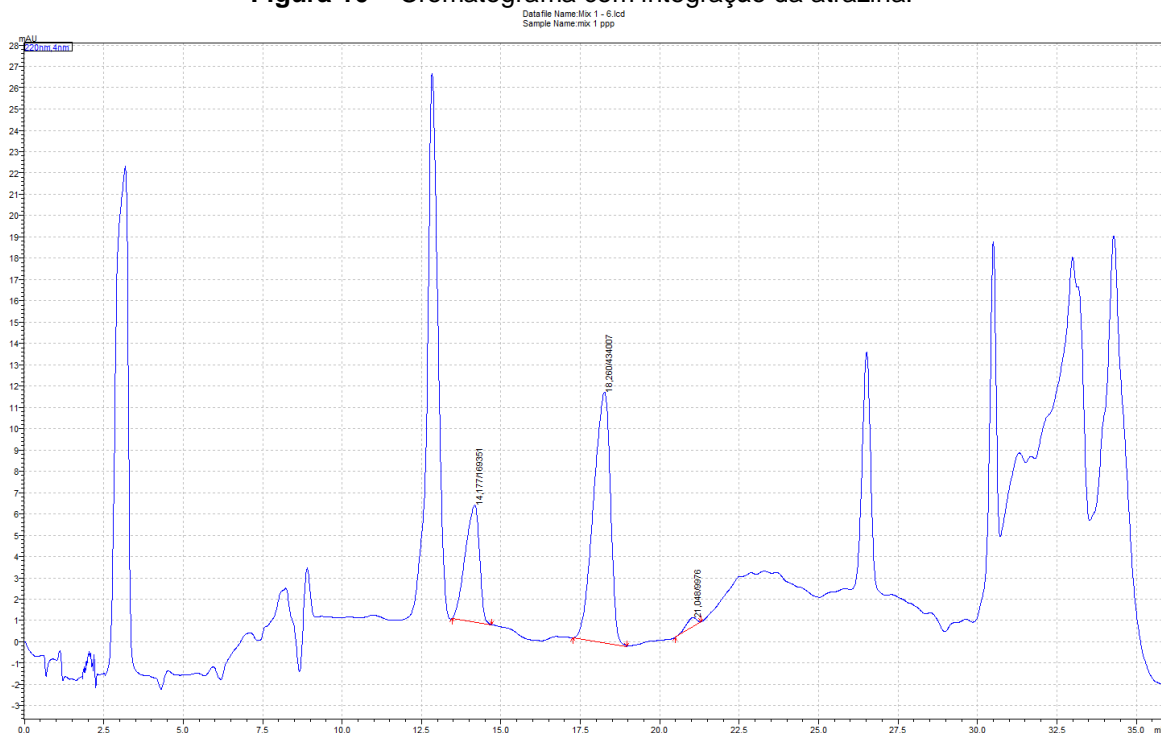
Figura 9 – Cromatograma obtido sob condições ótimas em novo equipamento.



Fonte: autor (2021). Injeção de mistura de padrões de quatorze defensivos agrícolas ($1,00 \text{ mg L}^{-1}$) com o gradiente otimizado usando HPLC/DAD obtido em 254 nm. Condições cromatográficas: Solvente A (água) e B (Etanol 89%, v/v), em gradiente linear de eluição: 0-3 min: 18% (v/v) de B em A; 4-18 min: 25% (v/v) de B em A; 20-27 min: 35% (v/v) de B em A; 29-32 min: 55% (v/v) de B em A; 34-36 min: 18% (v/v) de B em A a $39 \text{ }^\circ\text{C}$ e $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. 1) Metomil; 2) Aldicarbe; 3) Hexazinona; 4) Bendiocarbe; 5) Carbaril; 6) Atrazina*; 7) Ametrina; 8) Metiocarbe. *Destaque na figura 10.

A atrazina não ficou visível na figura 9 frente aos demais picos e principalmente por 254 nm não ser o seu comprimento de onda de máxima absorção, por isso a figura 10 é mostrada em 220 nm, onde o analito apresenta melhor absorção. O pico referente a atrazina era aparente no equipamento em que o método foi desenvolvido, no entanto, ao mudar o equipamento, esse analito é separado muito próximo a um ruído, o que causa essa quase ocultação do pico quando apresentado junto aos demais analitos.

Aditivamente, pela necessidade da mudança de equipamento de HPLC para a continuidade do estudo, com a validação do método e, principalmente, pela separação cromatográfica ter sido alterada com modificação dos analitos separados, foram também calculados os parâmetros de avaliação para o método obtido no equipamento de HPLC novo (tabela 5).

Figura 10 – Cromatograma com integração da atrazina.

Fonte: Autor (2021). Cromatograma obtido em 220 nm.

Tabela 5 – Parâmetros de avaliação da separação cromatográfica em novo equipamento HPLC.

Analito	T_R	W_b	k	α	N	R_s
Metomil	3,18	0,91	0,39	5,13	193,44	5,22
Aldicarbe	8,23	1,02	0,76	1,71	1034,02	3,96
Hexazinona	12,72	1,24	0,85	1,14	1677,44	1,19
Bendiocarbe	14,18	1,21	0,86	1,33	2207,36	3,04
Carbaril	18,26	1,48	0,89	1,17	2432,27	2,45
Atrazina	21,05	0,80	0,91	1,29	11215,21	6,80
Ametrina	26,51	0,81	0,93	1,16	17097,42	5,92
Metiocarbe	30,50	0,54	0,94	1,16*	51990,82	5,92*

Onde, Tr = tempo de retenção do pico; Wb = largura da base do pico; k = fator de retenção; α = fator de separação; N = número de pratos teóricos e Rs = resolução. * Valores do pico anterior.

Com isso, quando comparados aos dados da tabela 4, podemos afirmar que mais uma vez houve pouca variação no parâmetro k, mas ainda é permitida a manutenção do caráter de método eficiente. A exceção para esse parâmetro foi o pico do metomil, devido à proximidade deste pico com o pico do solvente; com relação ao

parâmetro α houve melhoria para seis analitos, o que indica boa seletividade no método.

Para o número de pratos teóricos médios (\bar{N}), sabendo da proporcionalidade desse parâmetro em relação ao comprimento da coluna (ITO, SHIMIZU e NAKATANI, 2021), o valor obtido é menor que os apresentados em alguns trabalhos, mas indica um aumento no valor desse parâmetro em relação aos valores apresentados na tabela 04 para o método anterior. Por obtermos um valor de 10.981,00, e por ser > 2000 , a avaliação desse parâmetro caracteriza uma boa separação dos analitos.

Em relação à resolução dos picos (R_s), houve uma melhoria nos valores apenas em dois analitos, no entanto, com a exceção do pico da hexazinona, os demais atendem aos critérios de boa resolução propostos pela IUPAC com valores > 2 . Esse valor abaixo de 2 para o pico da hexazinona, é relacionada à sua saída muito próxima do tempo de retenção do pico seguinte. Apesar dos valores não terem seguido a progressão esperada para as alterações realizadas do primeiro até o último método, os resultados obtidos para esses parâmetros são satisfatórios para indicar a eficiência do método e seletividade para a separação cromatográfica dos defensivos agrícolas estudados, estando dentro das faixas de valores especificados para essas características.

6.2 ANÁLISE DE MÉTODO VERDE

Devido ao crescimento da perspectiva verde nas análises químicas, hoje é extremamente corriqueiro que os trabalhos defendam que um método é verde pelo fato de utilizar reagentes menos tóxicos ou tempo de análise com relação ao gasto energético. Nesse sentido, Gałuszka (2012) propõe uma eco-escala, onde defende parâmetros para verificação da proposta ecológica do método. Assim, considerando a escala citada, tivemos como penalidades nesse método: a quantidade de reagente utilizado, entre 10 e 100 mL (2 pontos) x o risco menos grave do reagente (1 ponto) = 2 pontos; no parâmetro de energia do instrumento, como citado pelo autor, cromatógrafos líquidos consomem menos que 1,5 kWh portanto, penalidade de 1 ponto; por não haver risco associado ao método cromatográfico, este não é penalizado nessa categoria e; com relação ao desperdício tem-se 5 pontos por

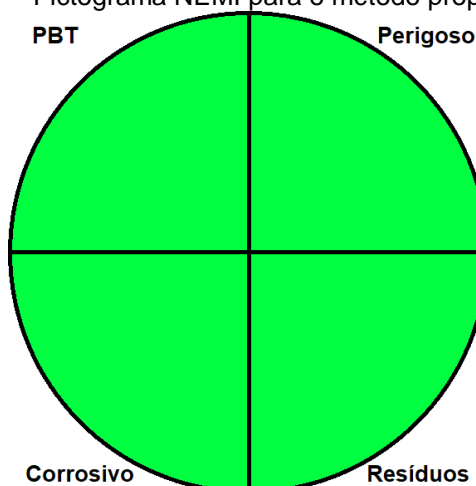
obtermos volume maior que 10 mL de resíduos e 3 pontos por não haver tratamento desses resíduos.

Assim, o método é penalizado em onze pontos e utilizando a equação 06, definimos que o método proposto se apresenta como ecologicamente amigável com um fator verde analítico de 89 (de 100). O caráter *eco-friendly* corrobora com o proposto pelo autor, que preconiza que um fator verde acima de 75 pontos indica uma excelente análise verde.

Como efeito comparativo, o método desenvolvido por Barchanska e colaboradores (2012), foi penalizado da seguinte forma: com relação ao parâmetro de reagentes, o cálculo é feito considerando a quantidade e os custos de cada reagente utilizado, assim a penalidade foi de 31 pontos; nos parâmetros para instrumentos, o gasto energético é para um cromatógrafo líquido, logo é penalizado em 1 ponto; o perigo operacional com os instrumentos foi penalizado em 3 pontos por conter etapa de evaporação de solvente orgânico e; com relação ao resíduo gerado, a penalidade é de 5 pontos, pelo volume acima de 10 mL e não tendo tratamento dos resíduos há mais 3 pontos penalizáveis, totalizando assim 43 pontos. Dessa forma, o método utilizado para análise de apenas um defensivo agrícola, por mais que seja considerado rápido, pelos apenas 10 minutos de separação cromatográfica, é apenas aceitável na proposta de análise verde, pois totaliza na eco-escala 57 pontos.

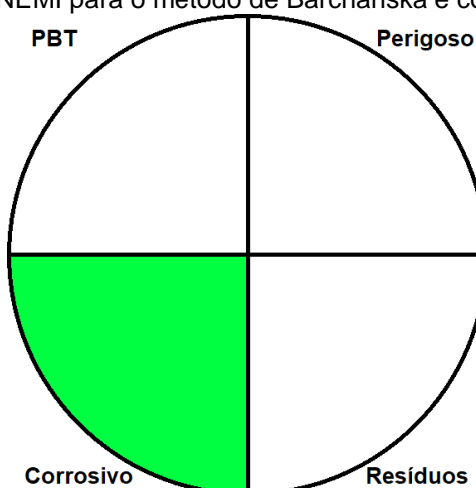
Com base na métrica da eco-escala, podemos então considerar que o método proposto nesse trabalho está muito a frente no quesito *eco-friendly*, uma vez que ainda que não contenha etapas de preparo de amostras, não faz uso de tipos e volumes de reagentes tão prejudiciais à saúde e ao meio ambiente. Em esclarecimento, o método citado em Barchanska e colaboradores (2012), utiliza por exemplo reagentes como hexano e metanol em grandes quantidades, 100 e 5 mL, respectivamente.

Outra métrica para verdadeira análise verde de um método é a rotulagem de NEMI, que leva em consideração a quantidade de resíduos gerados, o ambiente não corrosivo e se os reagentes são perigosos e se são do tipo PBT - persistentes, bioacumuláveis e tóxicos (TOBISZEWSKI, 2016). Mais uma vez o método proposto para separação cromatográfica dos oito defensivos agrícolas, como apresentado na figura 11, se mostrou com alto caráter verde frente à essa métrica.

Figura 11 – Pictograma NEMI para o método proposto.

Fonte: Autor (2021).

O pictograma de NEMI para esse método indica, segundo Tobiszewski (2016) que os reagentes utilizados não são persistentes, bioacumuláveis ou tóxicos; não são perigosos (EPA, 2021a); não apresentam caráter corrosivo, com pH abaixo de 2 ou acima de 12 e; a geração de resíduos é menor que 50 mL por amostra. Para efeito de comparação, ainda no método apresentado por Barchanska e colaboradores (2012), temos o pictograma que segue na figura 12, que é visualmente perceptível o baixo caráter verde proposto pelo método, uma vez que apenas uma de suas áreas é pintada.

Figura 12 – Pictograma NEMI para o método de Barchanska e colaboradores (2012).

Fonte: Autor (2021).

Ainda na aplicabilidade verde do método proposto, temos também a avaliação dos reagentes utilizados. Tobiszewski (2016) apresenta um esquema indicando os

principais reagentes utilizados em Química Analítica e suas respectivas cores de acordo com critérios de seleção, uso comum, similaridade de propriedades e categorização de riscos.

Figura 13 – Esquema indicativo do teor verde dos solventes comumente utilizados em Química Analítica.



Fonte: Adaptado de Tobiszewski (2016).

A partir do esquema apresentado na figura 13 percebe-se que o método proposto utiliza solventes verdes: a água e o etanol 89%, esse último que ainda possui em sua composição porções de metanol e propanol, em baixas porcentagens. Vale lembrar, que o caráter verde apresentado por Tobiszewski (2016), considera também proporções e tratamento dos resíduos, ou seja, ainda que não tenhamos feito o tratamento do resíduo, a proporção de metanol e propanol são muito baixas frente à quantidade de água e etanol, reagente conhecidamente não tóxico.

Assim, mais uma vez em comparação com o método de Barchanska e colaboradores (2012) podemos notar a escolha de solventes não verdes, como a acetonitrila. Além disso, é de grande importância o destaque que Tobiszewski e colaboradores (2009) fazem ao apontar que em um processo analítico a etapa que possui menor caráter verde, com maior contribuição à poluição, é a etapa da preparação de amostra, principalmente pelo constante uso de solventes orgânicos, etapa essa que o método proposto não possui.

6.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO INSTRUMENTAL

A validação dos métodos instrumentais é essencial para a comprovação científica da capacidade da utilização do método para aplicação. Essa validação ocorre através da análise de parâmetros que são avaliados experimentalmente e com as considerações e comparações com as agências reguladoras, é validado.

6.3.1 Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação indicam a sensibilidade do método. A menor concentração da espécie de interesse que pode ser detectada pelo instrumento é chamada de LD, e a menor concentração que pode ser quantificada é chamada de LQ (Ribeiro *et al.*, 2008). Estes valores foram calculados para o método proposto, através das equações 07 e 08, respectivamente, através da planilha automática disponibilizada por Ribeiro e colaboradores (2008) e são apresentados na tabela 6.

$$LD = 2 \cdot \frac{s_y \cdot t}{a_1} \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(y_c - \bar{y})^2}{a_1^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{Equação 07})$$

$$LQ = \left(\frac{y_h - a_0}{a_1}\right) + \left(\frac{s_y \cdot t}{a_1}\right) \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(y_h - \bar{y})^2}{a_1^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{Equação 08})$$

Apesar dos valores obtidos para o limite de detecção serem baixos, eles não foram menores que os esperados quando comparados aos trabalhos encontrados na literatura e que foram apresentados na tabela 1. No entanto, é importante lembrar que os métodos dispostos na tabela 1, possuem em seu procedimento uma etapa de pré-concentração dos analitos na amostra, ou seja, mesmo em níveis baixos estes analitos podem ser detectados e quantificados. Pois, segundo Bezerra e Ferreira (2006) ao passar por essa manipulação, são minimizados os efeitos interferentes da matriz da amostra e permitidas assim as análises por equipamentos analíticos com sensibilidade, seletividade e limite de detecção dentro da faixa de concentração do analito, devido a um aumento na concentração desses analitos na solução, pela

disponibilização no meio e conseqüentemente a diminuição dos valores de LD e LQ para os métodos.

Mas, em paralelo, temos no método desenvolvido um menor tempo de corrida cromatográfica (36 minutos) para a separação de oito analitos, uma vez que alguns métodos têm demandado muito tempo para suas análises, com dez minutos para a determinação de um analito (BARCHANSKA *et al.*, 2012) e 32 minutos para a separação de quatro analitos (LIU *et al.*, 2014). Sabendo disso, destaca-se ainda os efeitos ambientais amenizados com a utilização de solventes da fase móvel de menor toxicidade e sem etapa de pré-tratamento, ou seja, menor consumo de reagentes e conseqüentemente menor geração de resíduos.

Contudo, os limites de quantificação, quando comparados aos discriminados na tabela 1, são muito próximos, o que faz com que o método desenvolvido apresente boas características para o uso quando considerado os valores de LD e LQ, principalmente pelo caráter verde apresentado, como já discutido na seção 6.2.

Tabela 6 – Parâmetros e coeficientes de determinação das curvas analíticas de injeção direta.

Analito	Curva analítica		LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
	y=ax+b	R		
Metomil	y = 1E+06x – 140881,0	0,9978	0,52	0,77
Aldicarbe	y = 89258x + 2185,3	0,9926	0,94	1,41
Hexazinona	y = 194260x – 27152,0	0,9979	0,50	0,74
Bendiocarbe	y = 117273x – 21118,0	0,9979	0,50	0,75
Carbaril	y = 435015x – 67165,0	0,9976	0,53	0,79
Atrazina	y = 16628x - 5833,1	0,9953	0,75	1,12
Ametrina	y = 55750x - 8042,6	0,9977	0,53	0,79
Metiocarbe	y = 156389x – 15797,0	0,9979	0,51	0,75

Fonte: Autor (2021)

6.3.2 Linearidade

Um método é tido como linear, quando a faixa do sinal analítico produzido é proporcional à concentração (RIBEIRO *et al.*, 2008). A verificação da linearidade pode ser feita através da obtenção de curvas analíticas e suas respectivas equações, as quais permitirão a previsão das concentrações de soluções desconhecidas, a partir dos sinais analíticos obtidos. A partir disso, a avaliação da linearidade é feita com o

coeficiente de correlação dentro da faixa recomendada pela ANVISA e pela análise gráfica dos resíduos observando a existência de homocedasticidade ou heterocedasticidade.

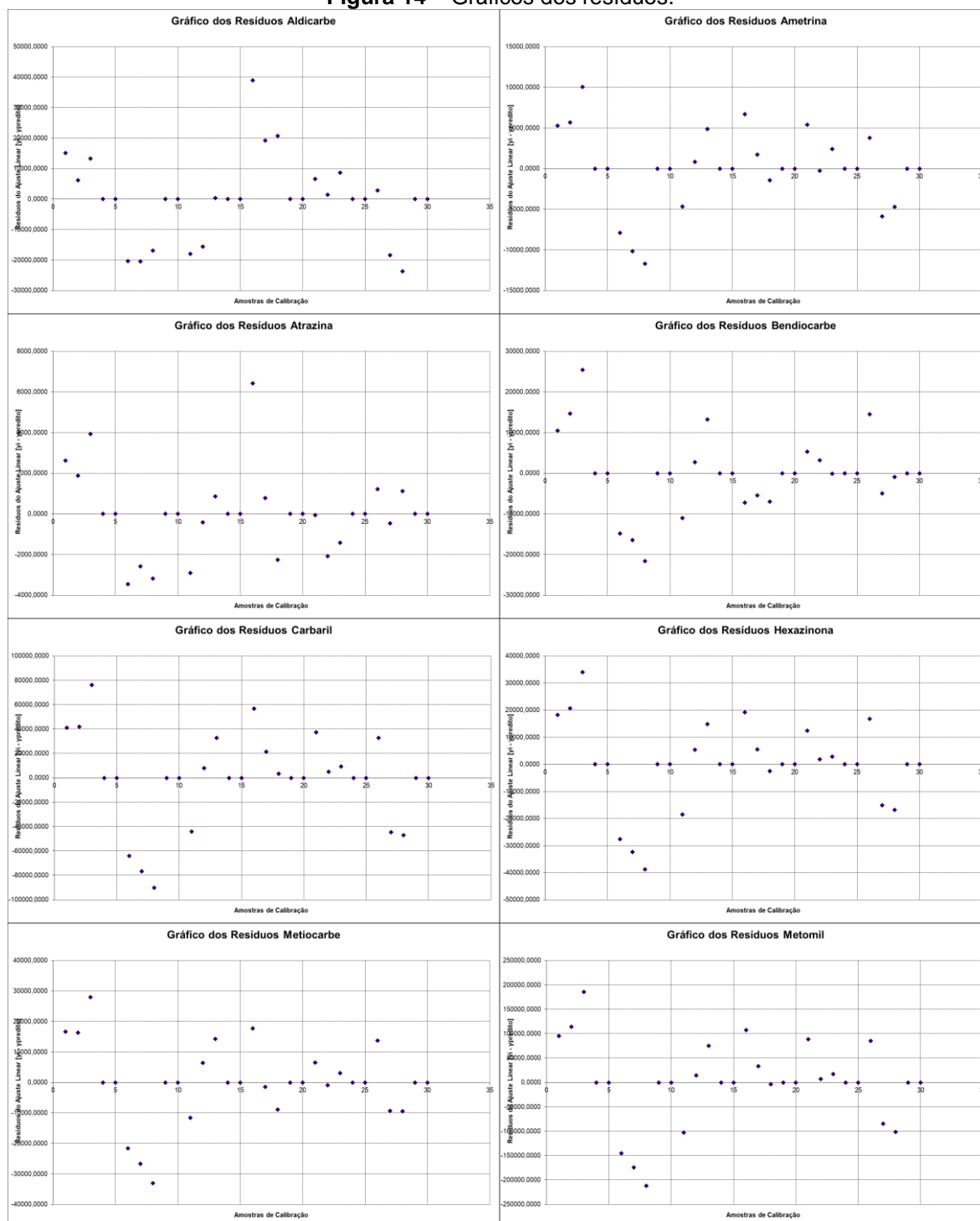
Para avaliação desse parâmetro foi construída uma curva analítica, a qual possibilitou, verificar a geração de resultados proporcionais, dentro da faixa estudada. A curva foi obtida com soluções diluídas nas concentrações 0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00 e 5,00 mg L⁻¹.

Considerando os dados obtidos, avalia-se a existência da linearidade através dos coeficientes de correlação (r) obtidos para cada analito, visto que todos os valores foram superiores a 0,99 (tabela 6) conforme recomendado pela ANVISA, ou seja, há um ajuste da equação da curva analítica com o experimento. No entanto, apenas a proximidade a 1 do coeficiente de correlação não é parâmetro suficiente para indicar a linearidade de um método (RIBEIRO *et al.*, 2008; OLIVIERI, 2015) e por isso deve-se também considerar os gráficos de resíduos dos analitos na avaliação da linearidade (figura 14).

Ao verificarmos a distribuição dos erros contidos nos gráficos de resíduos apresentados na figura 14, percebemos que os resíduos possuem homocedasticidade devido à dispersão dos resíduos se manterem iguais por todo o eixo X, por isso, estão normalmente distribuídos. Afinal, segundo Malyarets e colaboradores (2018), a homocedasticidade indica uma constância na variação dos erros e se houver a heterocedasticidade torna difícil a avaliação dos desvios padrão associados aos erros.

Assim, o fato desses gráficos não apresentarem heterocedasticidade, significa que o modelo não possui falhas. Isso corrobora com o apresentado por Ribeiro e colaboradores (2008), ao indicar que o ajuste ideal de uma curva, ou seja, sua linearidade, deve apresentar erros com distribuição uniforme e variância constante (homocedasticidade), o que é representado para todos os analitos nos gráficos apresentados na figura 14.

Figura 14 – Gráficos dos resíduos.



Fonte: Autor (2021). Gráficos gerados no *software* Excel na planilha automática disponibilizada por Ribeiro *et al.* (2008).

6.3.3 Precisão

Foram realizados testes de repetibilidade (intra-dia) e precisão inter-dia. O primeiro representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de

um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, e o segundo avalia o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos, como diferentes dias (SANTANA, 2014). Para a avaliação da repetibilidade foram realizadas dez injeções a $1,00 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto que a avaliação da precisão inter-dia ocorreu com três injeções, de soluções com concentrações em $1,00$; $3,00$ e $5,00 \text{ mg L}^{-1}$, em três dias não consecutivos. Os dados obtidos estão apresentados nas tabelas 7 e 8

Tabela 7 – Precisão intra-dia expressa pelo desvio padrão relativo obtido em $1,00 \text{ mg L}^{-1}$.

Analito	RSD (%)
Metomil	0,39
Aldicarbe	2,88
Hexazinona	0,82
Bendiocarbe	0,37
Carbaril	0,71
Atrazina	3,75
Ametrina	1,40
Metiocarbe	1,64

Fonte: Autor (2021).

Tabela 8 – Precisão inter-dia expressa pelo desvio padrão relativo obtido em $1,00$; $3,00$ e $5,00 \text{ mg L}^{-1}$.

Analito	RSD (%)		
	$1,00 \text{ mg L}^{-1}$	$3,00 \text{ mg L}^{-1}$	$5,00 \text{ mg L}^{-1}$
Metomil	5,94	1,65	2,16
Aldicarbe	8,71	5,21	2,48
Hexazinona	4,70	5,20	4,25
Bendiocarbe	5,30	2,19	16,37
Carbaril	5,87	3,02	3,17
Atrazina	8,41	4,75	9,67
Ametrina	4,58	1,68	3,72
Metiocarbe	4,42	2,37	3,03

Fonte: Autor (2021).

Todos os valores de RSD obtidos são considerados aceitáveis, pois segundo Ribani (2004), valores até 20% demonstram precisão do método.

6.3.4 Robustez

A robustez é um parâmetro entendido como a capacidade do método em manter a resistência do seu comportamento frente a pequenos desvios em suas condições experimentais (THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002). Esse parâmetro foi avaliado aplicando um planejamento fatorial completo de dois níveis (2^2), com triplicata do ponto central (condições ótimas estabelecidas), onde temperatura e fluxo foram variados. Ao avaliar os dados obtidos, a curvatura para 95% de confiança mostrou-se não significativa, indicando um método robusto no domínio experimental estudado, sendo o teste de curvatura sinalizado por Ferreira e colaboradores (2017), como um dos indicativos para a robustez na validação de métodos instrumentais.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A otimização do método cromatográfico permitiu a separação e identificação simultânea de oito defensivos agrícolas, apresentando bons resultados como indicados nos valores de resolução acima de 1,5 em praticamente todos os analitos; número de pratos teóricos médio acima de 2000; fator de retenção acima de 0,5 e fator de separação maior que 1,0. O método cromatográfico associado à detecção em DAD apresentou ainda baixos limites de detecção, indicando boa sensibilidade para um método que não possui etapa de preparo de amostras.

Além disso, o método cromatográfico desenvolvido apresentou características adequadas à adoção da Química Verde, dentro das métricas de eco-escala e pictograma de NEMI, o que corrobora com a projeção de utilização do método futuramente seguindo os princípios ecologicamente modernos. Paralelo a essas métricas, o método apresentou também baixo consumo de reagentes tóxicos, além de ter demonstrado ser rápido e eficiente para a separação dos defensivos agrícolas estudados.

Assim, os resultados obtidos possibilitarão a expansão do trabalho com a aplicação associada à uma etapa de extração de amostras alimentícias e ou ambientais. Isso porque, a avaliação desse método, com os parâmetros de validação cromatográfica, indicou que os resultados foram satisfatórios atingindo boa seletividade e precisão.

8 PERSPECTIVAS

- Aplicar o método de separação cromatográfica a um método de extração, seguindo os princípios da Química Verde, em amostras alimentícias, para verificar a exatidão do método e sua usabilidade na sociedade para determinação de defensivos agrícolas.
- Publicar artigo científico para favorecer o crescimento de aplicações verdes na Química Analítica.

REFERÊNCIAS

- ABOLGHASEMI, M. M.; PIRYAEI, M.; IMANI, R. M. Deep eutectic solvents as extraction phase in head-space single-drop microextraction for determination of pesticides in fruit juice and vegetable samples. **Microchemical Journal**, v. 158, p. 105041-105046, 2020.
- AMÓRTEGUI, J. C. E; DALLOS, J. A. G. Practical aspects in gas chromatography–mass spectrometry for the analysis of pesticide residues in exotic fruits. **Food Chemistry**, v. 182, p. 14-22, 2015.
- ASENSIO-RAMOS, M. *et al.* Ionic liquid-dispersive liquid–liquid microextraction for the simultaneous determination of pesticides and metabolites in soils using high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 30, p. 4808-4816, 2011.
- AZEVEDO, R. S. A. *et al.* Multivariate analysis of the composition of bioactive in tea of the species *Camellia sinensis*. **Food chemistry**, v. 273, p. 39-44, 2019.
- BALESTEROS, M. R. **Desenvolvimento e otimização de metodologia para análise de atrazina e seus produtos de degradação por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar**. 2009. Dissertação (Mestrado em Química). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, 2009.
- BALLESTEROS-GÓMEZ, A.; SICILIA, M. D.; RUBIO, S. Supramolecular solvents in the extraction of organic compounds. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 677, p. 108-130, 2010.
- BARCHANSKA, H. *et al.* Monitoring of atrazine in milk using a rapid tube-based ELISA and validation with HPLC. **Chemosphere**, v. 87, n. 11, p. 1330-1334, 2012.
- BARONAS, R. L. Agrotóxico versus pesticida: notas de leitura sobre polêmica e a memória discursiva. **Bakhtiniana: Revista de Estudos do Discurso**, v. 14, n. 2, p. 62-87, 2019.
- BEZERRA, M. A.; FERREIRA, S. L. C. **Extração em ponto nuvem: princípios e aplicações em química analítica**. Vitória da Conquista: Edições UESB, 2006.
- BIZIUK, M.; STOCKA, J. Multiresidue methods for determination of currently used pesticides in fruits and vegetables using QuEChERS technique. **International Journal of Environmental Science and Development**, v. 6, n. 1, p. 18-22, 2015.
- BOL'SHAKOV, D. S.; AMELIN, V. G. Determination of pesticides in environmental materials and food products by capillary electrophoresis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 71, n. 10, p. 965-1013, 2016.

BORGES, E. M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. Possibilidades e limitações no uso da temperatura em cromatografia líquida de fase reversa, **Química Nova**, v. 33, n. 4, p.945-953, 2010

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Índice Monográfico Aldicarbe**, 2015. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/anos-antiores/agrotoxico-utilizado-como-chumbinho-e-retirado-do-mercado-brasileiro>. Acesso em: 09 maio 2019.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Índice Monográfico Atrazina**, 2020a. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/a/4141json-file-1>. Acesso em 10 fev. 2021.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Índice Monográfico Bendiocarbe**, 2020b. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/b/4188json-file-1>. Acesso em 10 fev. 2021.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Índice Monográfico Carbaril**, 2020c. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/c/4219json-file-1>. Acesso em 10 fev. 2021.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Índice Monográfico Hexazinona**, 2020d. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/g-h-i/4383json-file-1>. Acesso em 10 fev. 2021.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Índice Monográfico Metiocarbe**, 2020e. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/m-n-o/4431json-file-1>. Acesso em 10 fev. 2021.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Índice Monográfico Ametrina**, 2021a. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/a/4139json-file-1>. Acesso em 04 set. 2021.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Índice Monográfico Metomil**, 2021b. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/m-n-o/4424json-file-1>. Acesso em 04 set. 2021.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lei Nº 7.802, de 11 de julho de 1989**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L7802.htm>. Acesso em: 19 mar. 2020.

BRONDI, S. H. G. *et al.* Evaluation of the QuEChERS method and gas chromatography–mass spectrometry for the analysis pesticide residues in water and sediment. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 86, n. 1, p. 18-22, 2011.

CAJKA, T. *et al.* Streamlining sample preparation and gas chromatography–tandem mass spectrometry analysis of multiple pesticide residues in tea. **Analytica Chimica Acta**, v. 743, p. 51-60, 2012.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos, SP: EdUFSCar, 2011.

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

DANIEL, D. *et al.* Determination of halosulfuron-methyl herbicide in sugarcane juice and tomato by capillary electrophoresis–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 175, p. 82-84, 2015.

DE LLASERA, M. P. G.; BERNAL-GONZÁLEZ, M. Presence of carbamate pesticides in environmental waters from the northwest of Mexico: determination by liquid chromatography. **Water research**, v. 35, n. 8, p. 1933-1940, 2001.

DE MARCO, B. A. *et al.* Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. **Saudi pharmaceutical journal**, v. 27, n. 1, p. 1-8, 2019.

DUARTE, J. S.; DORES, E. F. G. C.; VILLA, R. D. Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por vortex e ultrassom aplicada à determinação de agrotóxicos triazinas, triazinonas e o triazol flutriafol em água. **Química Nova**, v. 39, n. 8, p. 925-931, 2016.

EPA, U. S. **Changes to the TRI List of Toxic Chemicals**. Disponível em: https://www.epa.gov/sites/default/files/2020-02/documents/tri_chemical_list_changes_02_24_2020.pdf. Acesso em: 03 nov. 2021a.

EPA, U. S. **Toxic Release Inventory**. Disponível em: <https://www.epa.gov/toxics-release-inventory-tri-program/what-toxics-release-inventory#What%20are%20TRI%20toxic%20chemicals?> . Acesso em: 03 nov. 2021b.

FARAJZADEH, M. A. *et al.* Application of elevated temperature-dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organophosphorus pesticides residues in aqueous samples followed by gas chromatography-flame ionization detection. **Food Chemistry**, v. 212, p. 198-204, 2016.

FARINA, Y. *et al.* Determination of pesticide residues in leafy vegetables at parts per billion levels by a chemometric study using GC-ECD in Cameron Highlands, Malaysia. **Food Chemistry**, 224, 55-61, 2017.

FERREIRA, S. L. C. *et al.* Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs. **Microchemical Journal**, v. 131, p. 163-169, 2017.

FURUSAWA, N. A toxic reagent-free method for normal-phase matrix solid-phase dispersion extraction and reversed-phase liquid chromatographic determination of aldrin, dieldrin, and DDTs in animal fats. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 378, n. 8, 2004.

GAŁUSZKA, A. *et al.* Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 61-72, 2012.

GEIGER, M.; HOGERTON, A. L.; BOWSER, M. T. Capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 577-596, 2012.

HERNÁNDEZ-BORGES, J. *et al.* Pesticide analysis by capillary electrophoresis. **Journal of separation science**, v. 27, n. 12, p. 947-963, 2004.

HUANG, Y. *et al.* Determination of multi-pesticide residues in green tea with a modified QuEChERS protocol coupled to HPLC-MS/MS. **Food chemistry**, v. 275, p. 255-264, 2019.

ITO, M.; SHIMIZU, K.; NAKATANI, K. Three-dimensional graphing representing six variables for speed and separation performance in liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1653, p. 462417, 2021.

JAHANGIRIAN, H. *et al.* A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: green nanomedicine. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 2957, 2017.

JUAN-GARCÍA, A.; FONT, G.; PICÓ, Y. Quantitative analysis of six pesticides in fruits by capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 26, n. 7-8, p. 1550-1561, 2005.

KAPSI, M. *et al.* Environmental monitoring and risk assessment of pesticide residues in surface waters of the Louros River (NW Greece). **Science of The Total Environment**, v. 650, p. 2188-2198, 2019.

KAUR, N. *et al.* Advanced green analytical chemistry for environmental pesticide detection. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 30, 100488, 2021.

KHUSH, G. S. Green revolution: the way forward. **Nature reviews genetics**, v. 2, n. 10, p. 815-822, 2001.

KIM, K. H.; KABIR, E.; JAHAN, S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Science of the Total Environment**, v. 575, p. 525-535, jan. 2017.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas: Editora Átomo, 2009.

LIU, T. *et al.* Determination of triazine herbicides in milk by cloud point extraction and high-performance liquid chromatography. **Food chemistry**, v. 142, p. 358-364, 2014

LIU, W.; QUAN, J.; HU, Z. Detection of organophosphorus pesticides in wheat by ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction combined with HPLC. **Journal of analytical methods in chemistry**, v. 2018, 2018.

ŁOZOWICKA, B.; RUTKOWSKA, E.; JANKOWSKA, M. Influence of QuEChERS modifications on recovery and matrix effect during the multi-residue pesticide analysis in soil by GC/MS/MS and GC/ECD/NPD. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 8, p. 7124-7138, 2017.

MALYARETS, L. *et al.* The heteroskedasticity test implementation for linear regression model using MATLAB. **Informatica**, v. 42, n. 4, 2018.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cresce número de registros de produtos biológicos para uso agrícola**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/cresce-numero-de-registros-de-produtos-biologicos-para-uso-agricola>. Acesso em 20 ago. 2021.

MIGHELI, M. Land ownership and use of pesticides. Evidence from the Mekong Delta. **Journal of Cleaner Production**, v. 145, p. 188-198, 2017.

MITRA, S. **Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry Chemical Analysis**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2003

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 2, p. 549-599, 2017.

NARENDERAN, S. T.; MEYYANATHAN, S. N.; BABU, B. Review of pesticide residue analysis in fruits and vegetables. Pre-treatment, extraction and detection techniques. **Food Research International**, v. 133, 109141, 2020.

OLIVEIRA, A. S. *et al.* Development and Validation of an Eco-friendly HPLC-UV-DAD Method for the Determination of Allopurinol in Pharmaceuticals with Application to In vitro Dissolution Studies. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, 5, 13089-13101, 2021.

OLIVIERI, A. C. Practical guidelines for reporting results in single-and multi-component analytical calibration: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 868, p. 10-22, 2015.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003.

PIRSAHEB, M.; FATTAHI, N. Development of a liquid-phase microextraction based on the freezing of a deep eutectic solvent followed by HPLC-UV for sensitive determination of common pesticides in environmental water samples. **RSC advances**, v. 8, n. 21, p. 11412-11418, 2018.

PŁOTKA-WASYLKA, J. A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. **Talanta**, v. 181, p. 204-209, 2018.

RAVELO-PÉREZ, L. M. *et al.* Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of pesticides from bananas. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7336-7345, 2009.

RAZA, N.; KIM, K. Quantification techniques for important environmental contaminants in milk and dairy products. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 98, p. 79-94, 2018.

RECENA, M. C. P.; CALDAS, E. D. Percepção de risco, atitudes e práticas no uso de agrotóxicos entre agricultores de Culturama, MS. **Revista de Saúde Pública**, v. 42, p. 294-301, 2008.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L. *et al.* Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P. E.; ROCHA, M. M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas de saúde pública. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 7, p. 1-3, 2014.

SAMSIDAR, A.; SIDDIQUEE, S.; SHAARANI, S. M. A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and foodstuffs. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p. 188-201, 2018.

SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, L. *et al.* Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a new approach to analyse neonicotinoid insecticides. **Journal of Chromatography A**, v. 1359, p. 317-324, 2014.

SANTANA, D. A. **Análise de compostos fenólicos e atividade antioxidante em cachaças baianas**. 2014. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

SARAJI, M.; JAFARI, M. T.; MOSSADDEGH, M. Carbon nanotubes-silicon dioxide nanohybrids coating for solid-phase microextraction of organophosphorus pesticides followed by gas chromatography-corona discharge ion mobility spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1429, p. 30-39, 2015.

SCHNEIDERS, S. **Uso de agrotóxicos no estado do Paraná em 2016 e 2017**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

SECCIA, S. *et al.* Development and validation of a solid-phase extraction method coupled to high-performance liquid chromatography with ultraviolet-diode array detection for the determination of sulfonylurea herbicide residues in bovine milk samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 9, p. 1253-1259, 2011.

SILVA, M. F. O.; COSTA, L. M. A indústria de defensivos agrícolas. **BNDES Setorial**, n. 35, p. 233-276, 2012.

SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentos da Química Analítica**. 8ª ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2006.

SPUDEIT, D. A.; DOLZAN, M.D.; MICKE, G.A. Conceitos básicos em eletroforese capilar. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 4, p. 287-297, 2012.

STEFFEN, G. P. K.; STEFFEN, R. B.; ANTONIOLLI, Z. I. Contaminação do solo e da água pelo uso de agrotóxicos. **Tecno-lógica**, v. 15, n. 1, p. 15-21, 2011.

STOCKA, J. *et al.* Green Aspects of Techniques for the Determination of Currently Used Pesticides in Environmental Samples. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 7785-7805, 2011.

SUMMA, S. *et al.* Development and validation of an HPLC/DAD method for the determination of 13 sulphonamides in eggs. **Food chemistry**, v. 187, p. 477-484, 2015.

TIAN, H. Determination of chloramphenicol, enrofloxacin and 29 pesticides residues in bovine milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 83, n. 3, p. 349-355, 2011.

TOBISZEWSKI, M. *et al.* Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 8, p. 943-951, 2009.

TOBISZEWSKI, M. Metrics for green analytical chemistry. **Analytical methods**, v. 8, n. 15, p. 2993-2999, 2016.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TSIROPOULOS, N. G.; AMVRAZI, E. G. Determination of pesticide residues in honey by single-drop microextraction and gas chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 94, p. 634-644, 2011.

VELKOSKA-MARKOVSKA, L.; PETANOVSKA-ILIEVSKA, B. Optimization and development of SPE-HPLC-DAD method for the determination of atrazine, malathion, fenitrothion and parathion pesticide residues in apple juice. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 32, n. 2, p. 299-308, 2013.

WU, J. *et al.* Dispersive liquid-liquid microextraction for rapid and inexpensive determination of tetramethylpyrazine in vinegar. **Food Chemistry**, v. 286, p. 141-145, 2019.

WU, X. *et al.* An ionic liquid-based nanofluid of titanium dioxide nanoparticles for effervescence-assisted dispersive liquid-liquid extraction for acaricide detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1497, p. 1-8, 2017.

XIAO, Z. *et al.* Polydimethylsiloxane/metal-organic frameworks coated stir bar sorptive extraction coupled to gas chromatography-flame photometric detection for the determination of organophosphorus pesticides in environmental water samples. **Talanta**, v. 156-157, p. 126-133, 2016.

XIE, Y. *et al.* 3-Aminophenol-glyoxylic acid resin for the determination of triazine herbicides in tomatoes. **Analytica Chimica Acta**, v. 1061, p. 122-133, 2019.

XU, L. *et al.* Dispersive liquid-liquid microextraction combined with non-aqueous capillary electrophoresis for the determination of imazalil, prochloraz and thiabendazole in apples, cherry tomatoes and grape juice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 4, p. 745-751, 2015.

ZHAO, L. *et al.* Multi-class multi-residue analysis of pesticides in edible oils by gas chromatography-tandem mass spectrometry using liquid-liquid extraction and enhanced matrix removal lipid cartridge cleanup. **Journal of Chromatography A**, v. 1584, p. 1-12, 2019.