

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante para pesticidas carbamatos em frutos

Giovana Pedrina

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2021**

Giovana Pedrina
Bacharela em Ciências dos Alimentos

**Microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica
flutuante para pesticidas carbamatos em frutos-**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profa. Dra. **WANESSA MELCHERT MATTOS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2021

Pedrina, Giovana

Microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante para pesticidas carbamatos em frutos / Giovana Pedrina. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021.

66 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. DLLME-SFOD 2. Química analítica verde 3. Carbaril 4. Carbendazim 5. Carbofurano 6. Aminocarb I. Título

DEDICATÓRIA

À minha mãe Maria Aparecida da Silva Pedrina, ao meu pai Adalberto Antônio Pedrina e à minha irmã Bruna Pedrina. Sem eles, eu não teria chegado até aqui. Tenho muito orgulho de ter conquistado meu objetivo com eles ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha família. Ao meu pai Adalberto Antonio Pedrina, minha mãe Maria Aparecida da Silva Pedrina e minha irmã Bruna Pedrina, que são as pessoas mais importantes para mim. Agradeço por todo cuidado, apoio, incentivo e dedicação, não somente durante meu mestrado, mas em toda minha vida, tanto nos momentos bons, quanto nos difíceis. As dificuldades e alegrias deste ciclo tornaram-se de todos e tenho muita sorte de tê-los em minha vida. Eles são as minhas maiores inspirações.

À minha orientadora Profa. Dra. Wanessa Melchert Mattos, pela orientação, compreensão, apoio e por todos os aprendizados e oportunidades proporcionados. Extremamente presente, dedicada e humilde, também se tornou uma inspiração para mim, tanto pela trajetória profissional quanto pessoal. Ter a oportunidade de trabalhar com ela é uma honra.

Ao Grupo de Estudos em Química Analítica Verde (GEQAV) do qual faço parte, aos membros que conheci e convivi nesses dois anos, agradeço pelo companheirismo, aprendizados, colaboração e pelos momentos de descontração, muito importantes durante esse processo.

Gostaria de agradecer a todos os meus amigos que estiveram comigo durante o mestrado. Em especial minha amiga, desde o Ensino Médio (2009), Bianca Cristina Buzati, que me apoiou e acompanhou esse processo desde o começo.

EPÍGRAFE

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender”

Marie Curie

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. EMBASAMENTO TEÓRICO	19
2.1. Frutas, hortaliças e resíduos de pesticidas	19
2.2. Carbendazim.....	20
2.3. Aminocarb	20
2.4. Carbofurano	21
2.5. Carbaril.....	22
2.6. Química verde e química analítica verde	23
2.7. Preparo da amostra.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Equipamentos e acessórios	31
3.2. Reagentes e soluções.....	31
3.3. Procedimento experimental.....	32
3.4. Quantificação dos pesticidas.....	32
3.5. Análises Estatísticas	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1. Otimização dos parâmetros	36
4.2. DLLME-SFOD	54
4.3. Análises de amostras de frutos <i>in natura</i>	57
5. CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59

RESUMO

Microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante para pesticidas carbamatos em frutos

Carbamatos são pesticidas utilizados no controle de pragas, como insetos, fungos e vermes na agricultura, e estão associados a graves intoxicações em humanos e também danos ambientais. Portanto, o desenvolvimento de métodos de extração e quantificação de resíduos de pesticidas em alimentos tornou-se de fundamental importância. Neste contexto, o objetivo desse estudo foi desenvolver um procedimento analítico limpo empregando a microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante para extração simultânea dos pesticidas carbamatos, carbendazim, aminocarb, carbofurano e carbaril em amostras de frutos. O procedimento experimental foi otimizado em que 308 μL de amostra foi adicionada em 100 μL de 1-decanol e 24 μL de acetonitrila, agitada a 200 rpm por 10 minutos, centrifugada por 15 minutos a 4000 rpm (20 °C) e refrigerada por 15 minutos até solidificação do solvente extrator. Em seguida, com o auxílio de uma seringa, a fase líquida foi retirada e as gotículas do solvente extrator, antes solidificadas, foram fundidas em temperatura ambiente. O extrato foi ressuscitado com 150 μL de acetonitrila e levado ao HPLC-UV (280 nm). Respostas lineares foram alcançadas e descritas pelas equações (mg L^{-1}): 0,04 a 8,00, Área do pico = $85,50 C - 1,07$, $R^2 = 0,999$ para o carbendazim; 0,5 a 8,00, Área do pico = $16,47 C - 2,04$, $R^2 = 0,997$ para o aminocarb; 0,08 a 8,00, Área do pico = $26,40 C - 2,25$, $R^2 = 0,999$ para o carbofurano; e 0,07 a 8,00, Área do pico = $85,78 C - 9,75$, $R^2 = 0,995$ para o carbaril. Limites de detecção (mg L^{-1}) foram estimados em 0,03 para carbendazim; 0,2 para aminocarb; 0,07 carbofurano; e 0,06 para carbaril. Os coeficientes de variação ($n = 11$) variaram de 2,3 a 5,2 %. Estudos de adição e recuperação para os pesticidas em amostras de maçã, morango e tomate foram realizados pela metodologia proposta, obtendo porcentagens de recuperação estimadas entre 66 e 102%. A metodologia proposta com o emprego da microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante apresenta vantagem na miniaturização do processo, reduzindo as quantidades de amostra e solvente, conseqüentemente o custo e atende os princípios da química analítica verde.

Palavras-chave: DLLME-SFOD, Química analítica verde, Carbaril, Carbendazim, Carbofurano, Aminocarb

Abstract

Dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of the floating organic drop for carbamate pesticides in fruits

Carbamates are pesticides used in pest control, such as insects, fungi and worms in agriculture, and they are associated with poisoning in humans and to environmental damage. Recently, the development of methods for the extraction and quantification of pesticide residues in foods has become highly relevant. Therefore, the aim of this study was to develop a clean analytical procedure exploiting dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of the floating organic droplet for simultaneous extraction of pesticides carbamates, *that is*, carbendazim, aminocarb, carbofuran, and carbaryl in fruits. The optimized conditions for the procedure consider a consumption of 308 μL of sample which was added in 100 μL of 1-decanol and 24 μL of acetonitrile. After stirring this mixture at 200 rpm for 10 minutes, it was centrifuged for 15 minutes at 4000 rpm (20 °C) and refrigerated for 15 minutes until that the extractant solvent would solidify. Then using a syringe, the liquid phase was removed and the droplets of the extractant solvent, previously solidified, were melted at room temperature. The extract was then resuspended with 150 μL of acetonitrile and a chromatographic separation coupled to a UV-detection (280 nm) was carried out linear responses were achieved and they can be described by the following (mg L^{-1}): 0.04 to 8.00, Peak area = 85.50 C - 1.07, $R^2 = 0.999$ for carbendazim; 0.5 to 8.00, Peak area = 16.47 C - 2.04, $R^2 = 0.997$ for the aminocarb; 0.08 to 8.00, Peak area = 26.40 C - 2.25, $R^2 = 0.999$ for carbofuran; and 0.07 to 8.00, Peak area = 85.78 C - 9.75, $R^2 = 0.995$ for the carbaryl. Detection limits (mg L^{-1}) were estimated at 0.03 for carbendazim; 0.2 for aminocarb; 0.07 for carbofuran; and 0.06 for carbaryl. The coefficient of variation ($n = 11$) of the referred procedure varied from 2.3 to 5.2%. Recovery studies were carried out and considered as samples apple, strawberry and tomato, obtaining rates in the range of 66 and 102%. The proposed procedure presents as a main advantage the miniaturization of the analytical process, in compliance with green analytical chemistry approach, representing a cost-effective alternative to identify the residues of those analytes in foods.

Keywords: DLLME-SFOD, Green analytical chemistry, Carbaryl, Carbendazim, Carbofuran, Aminocarb

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural do carbendazim (Fonte: ANVISA, s/d).....	20
Figura 2. Fórmula estrutural do aminocarb (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH - NIH, s/d).	21
Figura 3. Fórmula estrutural do carbofurano (Fonte: ANVISA, s/d).	22
Figura 4. Fórmula estrutural do carbaril (ANVISA, s/d).....	22
Figura 5. Número de publicações indexadas no Web of Science com o termo " <i>Green analytical chemistry</i> " até 2020 (09/04/2021) (Fonte: AUTOR).....	24
Figura 6. Etapas básicas da microextração em gota suspensa, (A) antes da injeção com agitação; (B) injeção da microgota e partição do analito e (C) recolhimento da microgota para análise (Fonte: PINTO; PEDROSO, 2015).....	26
Figura 7. Etapas básicas da microextração em fase líquida com fibra oca, (A) três e (B) duas fases (Fonte: adaptado de MERIB; CARASEK, (2013).	27
Figura 8. Etapas básicas da microextração líquido-líquido dispersiva (Fonte: adaptado de MARTINS et al., 2012).	28
Figura 9. Esquema do procedimento experimental (Fonte: Autor).	32
Figura 10. Cromatograma dos carbamatos 8 mg L ⁻¹ (1) carbendazim; (2) aminocarb; (3) carbofurano e (4) carbaril.	35
Figura 11. Porcentagem de efeitos dos contrastes das variáveis para os carbamatos. C1: tipo de solvente extrator; C2: tipo de solvente dispersor; C3: volume da amostra (µL); C4: volume de solvente extrator (µL); C5: volume de solvente dispersor (µL); C6: tempo de agitação (min); C7: tempo de centrifugação (min) e C8: velocidade de centrifugação (rpm).....	40
Figura 12. Carbendazim - Teste F para a média quadrática da regressão e do resíduo (azul) e para a média quadrática da falta de ajuste e do erro puro (vermelho).	43
Figura 13. Aminocarb - Teste F para a média quadrática da regressão e do resíduo (azul) e para a média quadrática da falta de ajuste e do erro puro (vermelho).	43
Figura 14. Carbofurano - Teste F para a média quadrática da regressão e do resíduo (azul) e para a média quadrática da falta de ajuste e do erro puro (vermelho).	43
Figura 15. Carbaril - Teste F para a média quadrática da regressão e do resíduo (azul) e para a média quadrática da falta de ajuste e do erro puro (vermelho).	44
Figura 16. Coeficientes de regressão, 1. Constante; 2. Volume de solvente dispersor; 3. Interação entre os volumes de solvente dispersor e da amostra. (A) Carbendazim; (B) Aminocarb; (C) Carbofurano e (D) Carbaril.	44
Figura 17. Gráficos de superfície de resposta (ajuste fino). (A) Carbendazim; (B) Aminocarb; (C) Carbofurano e (D) Carbaril.	45
Figura 18. Gráficos de contorno (ajuste fino). (A) Carbendazim; (B) Aminocarb; (C) Carbofurano e (D) Carbaril.....	46

Figura 19. Gráficos de superfície de resposta (robustez). (A) Carbendazim; (B) Aminocarb; (C) Carbofurano e (D) Carbaril.	49
Figura 20. Gráficos de contorno (robustez). (A) Carbendazim; (B) Aminocarb; (C) Carbofurano e (D) Carbaril.	50
Figura 21. Efeito da adição de sal sob as porcentagens de recuperação dos analitos.	52
Figura 22. Efeito do pH da amostra sob as porcentagens de recuperação dos analitos.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação do carbendazim (Fonte: adaptado de ANVISA, s/d).	20
Tabela 2. Classificação do aminocarb (Fonte: adaptado de NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH).....	21
Tabela 3. Classificação carbofurano (Fonte: adaptado de ANVISA, s/d).....	21
Tabela 4. Classificação do carbaril (Fonte: adaptado de ANVISA, s/d).	22
Tabela 5. Os 12 princípios de Química Verde propostos por Anastas e Warner (Fonte: ANASTAS; EGHBALI, 2009).	23
Tabela 6. Principais solventes utilizados na DLLME-SFOD e principais características (Fonte: MANSOUR; DANIELSON, 2017).	29
Tabela 7. Extração de pesticidas com DLLME-SFOD em alimentos, água e efluentes (Fonte: adaptado de MANSOUR; DANIELSON, 2017).	30
Tabela 8. Condições cromatográficas empregadas no trabalho desenvolvido (Fonte: Autor).	33
Tabela 9. Características analíticas dos pesticidas carbamatos.	36
Tabela 10. Variáveis selecionadas para triagem.....	38
Tabela 11. Planejamento fatorial fracionário 2^{8-4} com valores codificados.	38
Tabela 12. Planejamento fatorial fracionário 2^{8-4} com valores reais e porcentagens de recuperação dos analitos	39
Tabela 13. Variáveis selecionadas para ajuste fino.	41
Tabela 14. Planejamento fatorial 2^3 com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais com valores codificados.	41
Tabela 15. Planejamento fatorial 2^3 com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais com valores reais e porcentagens de recuperação dos analitos.	42
Tabela 16. Caminho de ascendência ao máximo com valores reais e porcentagens de recuperação dos analitos.	47
Tabela 17. Planejamento da robustez em torno do melhor resultado.	48
Tabela 18. Planejamento fatorial 2^2 com 3 pontos centrais e 4 pontos axiais com valores codificados.	48
Tabela 19. Planejamento fatorial 2^2 com 3 pontos centrais e 4 pontos axiais com valores reais e porcentagens de recuperação dos analitos.	48
Tabela 20. Porcentagens de recuperação previstas e obtidas experimentalmente para os analitos.	51
Tabela 21. Teste t aplicado para amostras independentes no estudo da adição de sal.	52
Tabela 22. Parâmetros otimizados da DLLME-SFOD para extração de quatro pesticidas carbamatos.	54

Tabela 23. Estudo de adição e recuperação dos analitos em amostras de fruto <i>in natura</i> (n = 3).....	57
Tabela 24. Procedimentos de extração de pesticidas empregados em amostras de alimentos.....	56

1. INTRODUÇÃO

Em busca de maximizar a produção de alimentos na agricultura, com a finalidade de suprir a demanda gerada pelo crescimento populacional mundial (observado a partir do século XVIII com a industrialização intensificada), o agricultor recorreu às tecnologias que pudessem impedir a conseqüente proliferação elevada de microrganismos, doenças e pragas nas lavouras. O uso de pesticidas foi uma das alternativas mais utilizadas por produtores rurais para sanar os problemas na produção (MILHOME et al., 2009).

No Brasil, o termo “agrotóxicos e afins” é definido pela Lei Federal n.º 7.802 de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002 (BRASIL, 2002), como:

“produtos e 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 plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”.

De acordo com dados divulgados pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO - *Food and Agriculture Organization*), o Brasil ocupa o 7º lugar do ranking mundial, em relação à quantidade de pesticidas aplicados por hectare de terra cultivada. Quando se trata da quantidade total aplicada desses insumos agrícolas, o país passa a ocupar a 11ª posição (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2017).

Segundo Wang et al. (2015), pesticidas geram preocupação, principalmente em relação ao meio ambiente e a saúde humana, devido a alta bioacumulação, toxicidade e persistência apresentada por esses compostos, uma vez que são lipossolúveis e apresentarem alta estabilidade.

De acordo com Menck et al. (2015), o leite humano pode ser usado como indicador eficiente da exposição humana a resíduos de pesticidas, sendo assim os autores analisaram estudos brasileiros referentes à concentração de pesticidas no leite

humano, exposição de gestantes e lactantes a esses compostos, e isso foi correlacionado com o desenvolvimento de defeitos congênitos e mortalidade de recém nascidos. De maneira geral, nos 21 estudos selecionados e analisados, foi detectada a presença de no mínimo um resíduo de pesticida no leite materno e associações com mortalidade e defeitos congênitos de neonatos.

Lazzeri (2017) afirma que, entre os anos de 2007 e 2014, foram notificados no Brasil, o total de 25.106 casos de intoxicação por pesticidas em indivíduos, destes 3.723 ocorreram no estado do Paraná. Considerando apenas os casos relatados, aproximadamente 8 brasileiros por dia foram contaminados por pesticidas.

Os pesticidas podem ser classificados de diversas formas: finalidade, grupo químico, origem química (orgânico ou inorgânico) e nível tóxico. A forma mais comum é de acordo com a estrutura química, como organoclorados, organofosforados, carbamatos, triazina, piretroides, cloroacetamidas, neonicotinoides, organossulfurados, fenilpirazóis, juvenoides e antiHJ (PAVANI, 2016).

Os carbamatos são compostos químicos amplamente utilizados na agropecuária como inseticidas, fungicidas, parasiticidas ou como zoossanitários e estão associados as intoxicações (inalação, ingestão oral ou exposição dérmica) que podem ser acidentais ou propositais (tentativa de suicídio ou envenenamento, por exemplo) em animais e seres humanos. A forma de ação é através da inativação da colinesterase, impedindo a inativação da acetilcolina, hormônio neurotransmissor cuja produção advém do sistema nervoso central e periférico. A toxicidade desses produtos decorre, sobretudo, de insuficiência cardiorrespiratória por comprometimento do sistema nervoso autônomo (SOUSA et al., 2009).

A exposição dérmica aos carbamatos torna-se mais crítica quando o organismo está em temperatura ambiente elevada. Experimentalmente, quantidades consideráveis de alguns carbamatos e seus metabólitos tem sido encontradas no leite de mães que sofreram algum tipo de exposição a esse composto. Como também são encontrados resíduos destes pesticidas em produtos comestíveis devido a aplicação como inseticidas em hortifrutigranjeiros (CALDAS, 2000).

No Brasil, o registro de agrotóxicos não tem prazo de validade, desta forma, uma vez que o produto é registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e entra para o mercado, este pode ser comercializado por tempo indeterminado. A reavaliação é feita apenas devido a novas informações oriundas dos sistemas de monitoramento, denúncias ou pesquisas científicas (ANVISA, 2020).

O pesticida carbendazim, também conhecido como MBC ou carbendazol, é utilizado no Brasil, em grande variedade de frutas e hortaliças, também é aplicado em culturas nas sementes de algodão, folhas de citros, sementes e folhas de feijão e soja, e em folhas de trigo (COUTINHO et al., 2006). O carbendazim, comumente é absorvido pelas vias orais, respiratórias e dérmica e, caso a ingestão for maior que o limite estabelecido (ingestão diária aceitável - IDA), pode gerar irritações, dermatites e queimaduras na pele e nos olhos. Pode causar alterações hormonais e também toxicidade no processo de reprodução humana (RAMA et al., 2014). Atualmente, a ANVISA iniciou o processo de reavaliação deste pesticida devido aos possíveis efeitos de carcinogenicidade, mutagenicidade e toxicidade reprodutiva e no desenvolvimento (ANVISA, 2020).

O pesticida aminocarb, é um inseticida carbamato utilizado na agricultura para tratar grãos armazenados, gramados, frutas e vegetais, a fim de controlar uma série de insetos (NI et al., 2009). Esse pesticida não possui registro na ANVISA, porém é monitorado pelo órgão.

O pesticida carbofurano age como inseticida, cupinicida, acaricida e nematocida. Atualmente, é proibido o uso no Brasil devido a reavaliação toxicológica conduzida pela ANVISA, conforme dispõe a Resolução RDC no 185, de 18 de outubro de 2017. O uso deste pesticida gera resíduos tanto em alimentos quanto, principalmente, na água, que representa grande risco à população, como efeitos neurotóxicos, teratogênicos funcionais (prejudica o feto na gravidez) e comportamentais (deficiência intelectual, por exemplo), assim como problemas de desenvolvimento. Essas características se enquadram nos critérios proibitivos de registro da Lei 7.802/1989 (ANVISA, 2018).

Carbaril, é um inseticida de amplo espectro, autorizado e registrado pela ANVISA, classificado toxicologicamente como classe II, usado em diversas culturas. Esse pesticida foi associado ao desenvolvimento de melanoma cutâneo, quando em contato com a pele e exposto a radiação solar, podendo se transformar em tumores cutâneos. Em exposição oral aguda ou crônica em seres humanos, pode causar tontura, confusão mental, náusea, parada respiratória e até morte devido a inibição da enzima acetilcolinesterase e conseqüentemente, hiperestimulação do sistema nervoso central (FERRUCIO, 2015).

Em 2001, a ANVISA juntamente com o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e a Secretaria de Saúde do Paraná deram início ao Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA).

O programa tem a finalidade de averiguar a qualidade dos alimentos *in natura* frente aos resíduos de pesticidas e garantir a segurança do consumidor (CANTARUTTI et al., 2008). Além disso, identifica os que excedem os limites máximos de resíduos (LMR) autorizados pela legislação, bem como a utilização de pesticidas não permitidos, tanto por não possuírem monografia aprovada, quanto por terem sido aplicados em lavouras (ou culturas) diferentes daquelas para as quais foram aprovados pela ANVISA.

No último relatório do PARA, publicado em dezembro de 2019, referente aos anos de 2017 e 2018, 4.616 amostras de alimentos foram analisadas, referente a 270 ingredientes ativos de agrotóxicos e 1.072 amostras foram consideradas insatisfatórias (23%). O carbendazim apresentou o maior índice de detecções, sendo 41 não autorizadas para a cultura e 21 acima do LMR. Também foram encontrados resíduos de carbofurano em 52 amostras, que teve uso e comercialização proibido em 2017 (ANVISA, 2019).

Segundo Cesarino et al. (2013), com o grande uso de diversos tipos de pesticidas, o contínuo monitoramento em baixos níveis de concentração tem sido uma das grandes dificuldades. Sendo assim, desenvolver novas tecnologias que permitam extrair e determinar pequenas quantidades de pesticidas em amostras ambientais (água, alimentos e solo) é um grande desafio.

Nas metodologias empregadas para extração de pesticidas, segundo Sanseverino (2000), são utilizadas grandes quantidades de solventes orgânicos e alguns são considerados muito tóxicos, como ésteres, hexano e misturas de solventes, como clorofórmio e metanol. Os problemas do uso desses compostos estão relacionados à toxicidade, inflamabilidade e os limites permitidos para a exposição de indivíduo. O manuseio, estocagem, transporte e descarte também são problemas adicionais, principalmente devido a poluição do meio ambiente. São considerados métodos caros devido ao grande tempo de execução e alto consumo de reagentes.

Dentre as metodologias tradicionais de preparo da amostra para extração de pesticidas em água, alimentos e fármacos, uma das mais utilizadas é a Extração Líquido-Líquido (LLE – *Liquid-Liquid Extraction*) (CALDAS et al., 2011). A LLE é um procedimento que baseia na separação de compostos com diferentes solubilidades em dois líquidos imiscíveis. Contudo, apesar de apresentar alta reprodutibilidade, possui algumas desvantagens, dentre elas: demanda muito tempo e intenso trabalho laboratorial; propensão ao pequeno potencial de automação e grande probabilidade de formação de emulsão e uso de grandes quantidades de solventes orgânicos de alta

pureza. Esses fatores tornam a extração cara e perigosa (geração de resíduos laboratoriais tóxicos) (ESRAFILI et al., 2007).

O desafio é o desenvolvimento de tecnologias limpas em substituição às utilizadas na maioria das vezes e conscientização da importância dessa prática. Os princípios da química verde conglomeram as áreas da ciência na totalidade, sempre tendo como base a sustentabilidade. O desenvolvimento desses princípios baseia-se: na utilização de reagentes alternativos e renováveis, visando reduzir os reagentes danosos e persistentes no meio ambiente; no uso de reagentes inócuos no processo de síntese com a finalidade de evitar perdas e aumentar o rendimento da produção; na utilização de solventes alternativos, substituindo os geralmente empregados; no aprimoramento de processos naturais (biossínteses e biocatálises, por exemplo); no desenvolvimento de compostos com baixa toxicidade (seguros); no desenvolvimento de reações que gerem menos resíduos, porém com maior rendimento; e diminuição do consumo de energia (PRADO, 2003).

A miniaturização da LLE é uma das tendências no preparo de amostras que visa diminuir a proporção entre os volumes do solvente orgânico e da fase aquosa significativamente, propiciando assim a Microextração Líquido-Líquido (LLME – *Liquid-Liquid Microextraction*). Entre as LLME, pode-se mencionar a Microextração em Gota Suspensa (SDME – *Single Drop Microextraction*); a Microextração em Fase Líquida com Fibra Oca (HF-LLME – *Hollow Fiber in Liquid-Liquid Microextraction*); e a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME – *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) (MORADI et al., 2011).

A DLLME foi apresentada por Rezaee et al. (2006) com a finalidade de extrair de amostras de água, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. A metodologia consiste na utilização de dois solventes, um extrator e outro dispersor que deve ser miscível tanto no solvente extrator (fase orgânica) quanto na amostra (fase aquosa) e o solvente extrator deve ser imiscível na fase aquosa. Devido à solução turva (gotículas dispersas) formada com a injeção da mistura de solventes na solução aquosa, ocorre aumento da área superficial de contato entre essas duas fases, portanto, a partição do analito é mais rápida. Entretanto, essa extração utiliza solventes tóxicos (geralmente hidrocarbonetos halogenados) e mais densos que a água, o que dificulta a separação do extrato.

Uma nova abordagem baseada na solidificação da gota orgânica flutuante (SFOD – *Solidification of Floating Organic Droplet*) foi apresentada, em que o solvente extrator deve atender alguns requisitos, como: baixa toxicidade, densidade menor do

que a água e ponto de fusão entre 10 – 30 °C. Após a extração, a gota orgânica é solidificada em baixa temperatura e, em seguida, facilmente coletada, fundida e conduzida para a determinação analítica. Porém, o problema da baixa área de contato entre o solvente e a amostra é uma desvantagem também (ZANJANI et al., 2007).

Na literatura são citadas novas maneiras de empregar a DLLME unindo vantagens com a SFOD como a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva baseada na Solidificação da Gota Orgânica Flutuante (DLLME-SFOD) (LEONG; HUANG, 2008) e a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva baseada na Solidificação da Gota Orgânica Flutuante Assistida por Ultrassom (UA-DLLME-SFOD) (WANG et al. (2015).

O método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), proposto por Anastassiades et al. (2003), trata-se de um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos e é o mais empregado para essa finalidade. As principais vantagens são: recuperações altas (> 85%); alta precisão, exatidão e rapidez; demanda baixas quantidades de solventes e baixo risco ao analista. Uma das desvantagens é a necessidade de associação com técnica analítica de alta sensibilidade como análise de espectrometria de massas devido a baixa relação amostra/extrato final que é de 1:1 (g/mL) (PRESTES et al., 2009). O custo dos kits de extração e do sorvente amina primária-secundária (PSA) também é elevado comparado com outros reagentes.

As extrações baseadas na DLLME são alternativas que oferecem diversos benefícios, dentre eles: operação simples, rápida, barata, com alta recuperação e alto fator de enriquecimento, menor dano ao meio ambiente e ao analista e com ampla aplicação na análise de analitos em baixa concentração. Apresentam vantagens destacáveis nos princípios da química verde, sobretudo, devido às drásticas reduções de solventes orgânicos durante o procedimento. Essas vantagens tornam-se ainda mais interessantes quando aliadas as vantagens da SFOD no desenvolvimento de procedimentos de extração de resíduos de pesticidas em amostras de alimentos. Além disso, o desenvolvimento de procedimentos limpos, simples, confiáveis, sensíveis e seletivos, enriquecem as alternativas disponíveis para as análises químicas.

2. EMBASAMENTO TEÓRICO

2.1. Frutas, hortaliças e resíduos de pesticidas

Os pesticidas são usados na agricultura para aumentar a vida útil, rendimento e qualidade das safras. Devido ao aumento da população e conseqüente aumento da demanda por alimento, os pesticidas estão sendo cada vez mais utilizados, causando contaminação do meio ambiente e potencial risco à saúde humana (MILHOME et al., 2009).

De acordo com a ANVISA, os pesticidas podem ter dois modos de ação, contato e sistêmico. Os sistêmicos agem no interior dos frutos e folhas e os pesticidas de contato atuam na superfície onde certa quantidade pode ser absorvida. Diante disso, foram estabelecidos parâmetros, como a IDA que trata da quantidade máxima de ingestão de pesticida aceitável por dia, com a finalidade de eliminar a possibilidade de danos à saúde. O LMR é o valor máximo de resíduos de pesticidas, em miligramas por quilo (mg de pesticida / kg de alimento), ocasionado pela aplicação de defensivos em determinada cultura agrícola. Para determinação desses valores, a ANVISA tem como referência os controles estabelecidos na União Europeia e nos Estados Unidos (ANVISA, 2020).

Em 2018, última publicação da ANVISA sobre frutas, verduras e legumes mais contaminados por resíduos de pesticidas, apontou o pimentão como mais contaminado, seguido do morango, pepino, alface, cenoura, abacaxi, beterraba, couve, mamão, tomate, laranja, maçã, arroz, feijão, repolho, manga, cebola e batata (HOSPITAL ESTADUAL DE JARAGUÁ - HEJA, 2018). A agência fez testes em 46.616 amostras e os resultados obtidos foram que 22.841,8 amostras (49%) estavam em conformidade, 13.052,5 amostras (28%) no limite máximo permitido, 10721,7 (23%) não conforme e 414,8 amostras (0,89%) foram consideradas com potencial risco agudo (DIÁRIO AGRÍCOLA AGROPLANNING, 2020).

Em julho de 2020, a Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA - *Food and Drug Administration*) e o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA - *United States Department of Agriculture*), finalizaram estudo no qual analisaram 43.700 amostras de 47 frutas e hortaliças frente à contaminação por pesticidas, referente ao ano de 2019. Denominado *Dirty Dozen*, o estudo é realizado anualmente e apontou os doze alimentos que continham maiores teores de agrotóxicos (ordem decrescente), uva passa, morango, espinafre, couve, nectarina, maçã, uva, pêsego, cereja, pera, tomate

e salsão (DIÁRIO AGRÍCOLA AGROPLANNING, 2020). Sendo assim, fica evidente a importância dos métodos de análises de pesticidas devido a ampla utilização destas substâncias na produção de alimentos, tanto no Brasil quanto no mundo e a correlação entre exposições agudas e/ou crônicas com intoxicações nos seres humanos, além da contaminação ambiental.

2.2. Carbendazim

O carbendazim, metil benzimidazol-2-ilcarbamato, é classificado conforme a ANVISA de acordo com a Tabela 1 e possui fórmula estrutural indicada na Figura 1.

Tabela 1. Classificação do carbendazim (Fonte: adaptado de ANVISA, s/d).

Fórmula molecular	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂
Grupo químico	Benzimidazol
Classe	Fungicida
Classificação toxicológica	Classe III
LMR	0,05 - 5,0 mg/kg
	Maçã 5,0 mg/kg
IDA	0,02 mg/kg

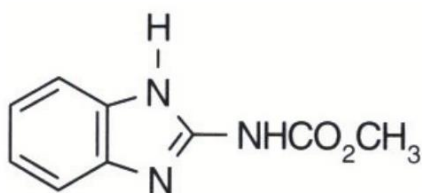


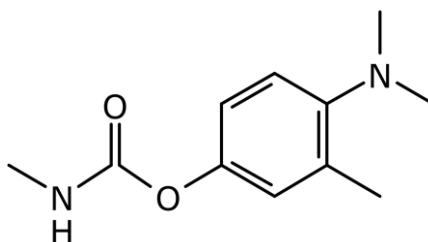
Figura 1. Fórmula estrutural do carbendazim (Fonte: ANVISA, s/d).

2.3. Aminocarb

O aminocarb, (4-Dimetilamino-3-metilfenil)*N*-metilcarbamato, é classificado conforme Tabela 2 e possui fórmula estrutural indicada na Figura 2.

Tabela 2. Classificação do aminocarb (Fonte: adaptado de NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH).

Fórmula molecular	$C_{11}H_{16}N_2O_2$
Grupo químico	Fenilmetilcarbamato
Classe	Inseticida, lesmicida e acaricida

**Figura 2.** Fórmula estrutural do aminocarb (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH - NIH, s/d).

2.4. Carbofurano

O carbofurano, 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-ilmetilcarbamato, é classificado conforme o portal da ANVISA de acordo com a Tabela 3 e possui fórmula estrutural indicada na Figura 3.

Tabela 3. Classificação carbofurano (Fonte: adaptado de ANVISA, s/d).

Fórmula molecular	$C_{12}H_{15}NO_3$
Grupo químico	Metilcarbamato de benzofuranila
Classe	Inseticida, cupinicida, acaricida e nematicida
Classificação toxicológica	Classe I
LMR	Proibido uso em 2017 no Brasil
IDA	-

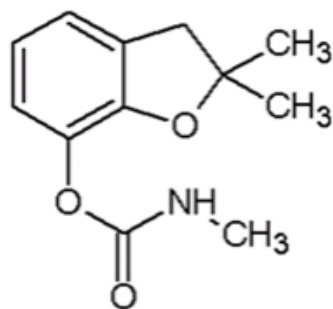


Figura 3. Fórmula estrutural do carbofurano (Fonte: ANVISA, s/d).

2.5. Carbaril

O carbaril, 1-naftil metilcarbamato, é classificado conforme o portal da ANVISA de acordo com a Tabela 4 e possui fórmula estrutural indicada na Figura 4.

Tabela 4. Classificação do carbaril (Fonte: adaptado de ANVISA, s/d).

Fórmula molecular	$C_{12}H_{11}NO_2$
Grupo químico	Metilcarbamato de naftila
Classe	Inseticida
Classificação toxicológica	Classe II
	0,02 - 100 mg/kg
LMR	Tomate 0,1 mg/kg
	Maçã 2,0 mg/kg
IDA	0,003 mg/kg

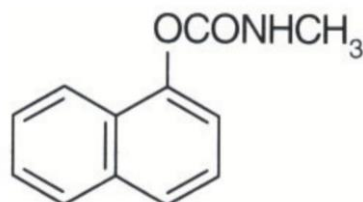


Figura 4. Fórmula estrutural do carbaril (ANVISA, s/d).

2.6. Química verde e química analítica verde

A partir da conferência de Estocolmo em 1972, a preocupação com o meio ambiente ficou em evidência, foi o marco da conscientização dos malefícios que as ações humanas causam ao ecossistema. Desde então, no mundo há concordância da necessidade de cuidado e preservação do meio ambiente.

O conceito da Química Verde foi inserido, trata-se do uso de capacidades e da ciências para diminuir ou extinguir a utilização ou geração de substâncias nocivas durante todo o processo químico, com o objetivo de poupar a saúde dos operadores e a degradação do meio ambiente (ANASTAS; EGHBALI, 2009). Desta forma, o foco está em eliminar ou reduzir a geração de resíduos tóxicos.

A Tabela 5 mostra 12 princípios de Química Verde propostos pelos idealizadores Anastas e Warner em 1998.

Tabela 5. Os 12 princípios de Química Verde propostos por Anastas e Warner (Fonte: ANASTAS; EGHBALI, 2009).

Princípio	Descrição
Prevenção	Evitar a geração de resíduos tóxicos
Economia atômica	Maior rendimento das reações
Síntese química mais segura	Uso e geração de substâncias com baixa ou nenhuma toxicidade ocupacional e ambiental
Projeto de produtos químicos mais seguros	Uso de produtos químicos eficientes com menor toxicidade possível
Uso de solventes e auxiliares mais seguros	Uso de substâncias inócuas sempre que possível
Uso de matérias-primas renováveis	Utilizar matérias-primas renováveis em detrimento das não renováveis
Redução de derivados	Evitar ou minimizar derivatização
Catálise	Preferência por reagentes catalíticos seletivos em detrimento de reagentes estequiométricos
Projeto de produtos de degradação	Planejamento para geração de produtos de degradação inofensivos e não persistentes no meio ambiente
Análise em tempo real para prevenção da poluição	Monitoramento constante para evitar a formação de substâncias perigosas
Prevenção de acidentes	Minimização de potenciais acidentes, visando maior segurança ocupacional e ambiental

A química analítica verde surgiu para suprir a necessidade da elaboração de metodologias mais sustentáveis. As principais estratégias estão na redução da quantidade e toxicidade de solventes e reagentes no pré-tratamento da amostra e na etapa de quantificação, principalmente com emprego de automação, miniaturização e análises diretas (ARMENTA et al., 2008).

A partir de 1990, notou-se mudança crescente na taxa de publicação de métodos relacionados a química analítica verde (Figura 5), evidenciando a preocupação da comunidade científica sobre o impacto ambiental (ARMENTA et al., 2008).

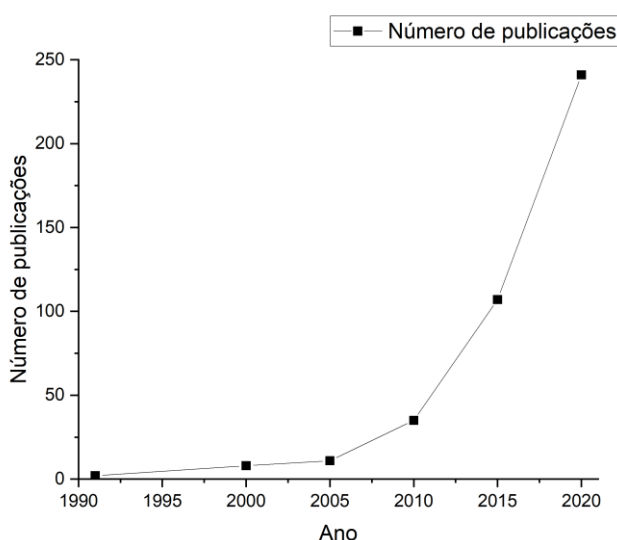


Figura 5. Número de publicações indexadas no Web of Science com o termo "Green analytical chemistry" até 2020 (09/04/2021) (Fonte: AUTOR).

2.7. Preparo da amostra

A importância dos métodos de análises de pesticidas é evidente devido a ampla utilização na produção de alimentos no Brasil e no mundo e a correlação da exposição aguda e/ou crônica com doenças (STOPPELLI; MAGALHÃES, 2005).

A etapa de preparo de amostra é uma das mais críticas do processo analítico e pode interferir a obtenção de resultados precisos e detectáveis (MARTINS et al., 2012). As metodologias mais utilizadas são baseadas em processos físicos, extrações líquido-líquido, sólido-líquido, com fluido supercrítico, assistida por microondas, por líquido pressurizado, ultrassônica e microextrações (MEIRA, 2015). As líquido-líquido podem ser realizadas de duas maneiras, contínua (tipo Soxhlet) ou descontínua, através da

obtenção do equilíbrio entre duas fases imiscíveis. Apesar de simples, oferece problemas referente à formação de emulsões, contaminação dos solventes e vidrarias e perdas devido a adsorções (MEIRA, 2015) .

As LLEs exigem grandes quantidades de amostra, solventes orgânicos puros e, geralmente, demandam muita manipulação dos extratos. Desta forma, são considerados métodos custosos, morosos e laboriosos (MEIRA, 2015). Outra dificuldade encontrada é que devido à complexidade da matriz alimentícia para a determinação de pesticidas, fazendo necessária a etapa de *clean up* do extrato. É nesta etapa que os interferentes e o efeito da matriz são reduzidos ou eliminados (CALDAS et al., 2011). Destaque é dado para as extrações miniaturizadas, pois não necessitam de grandes quantidades de amostra e, conseqüentemente, utilizam menor volume de solvente, quando comparadas aos métodos convencionais (MEIRA, 2015).

A miniaturização e simplificação de processos apresentam muitas vantagens em relação aos processos convencionais e se tornou tendência entre as metodologias analíticas, impulsionando a criação de procedimentos baseados em microextrações (TANG et al., 2018). As mais comuns são as que ocorrem em fase líquida (LPME ou LLME) e em fase sólida (SPME - *Solid Phase Micro-Extraction*).

As microextrações em fase líquida podem ocorrer de várias maneiras, sendo três grupos principais mais difundidos: microextração com gota única; microextração em fase líquida com fibra e a microextração líquido-líquido dispersiva (MERIB; CARASEK, 2013).

A microextração em gota suspensa envolve a partição do analito da amostra aquosa para o solvente orgânico e, logo após, a transferência deste solvente orgânico para a gota aquosa (processo denominado extração de retorno). Dentre os benefícios estão a simplicidade e minimalismo dos processos e reagentes. Dentre as desvantagens, a instabilidade da gota única em altas velocidades de agitação (TANG et al., 2018). A Figura 6 representa as etapas básicas da microextração em gota suspensa.

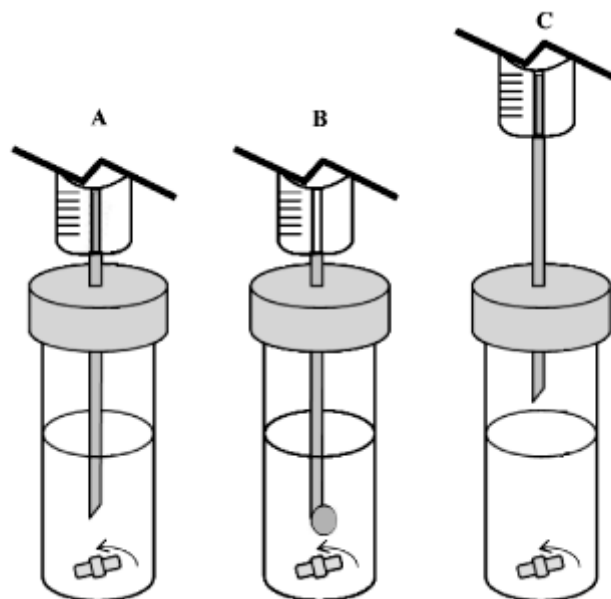


Figura 6. Etapas básicas da microextração em gota suspensa, (A) antes da injeção com agitação; (B) injeção da microgota e partição do analito e (C) recolhimento da microgota para análise (Fonte: PINTO; PEDROSO, 2015).

A microextração em fase líquida com fibra oca consiste na imobilização do solvente orgânico, imiscível em água, na membrana oca porosa. Nesse sistema é injetado um volume da solução receptora (aquosa ou orgânica), em seguida o conjunto é colocado dentro da amostra aquosa para que ocorra a extração. Os analitos passam da amostra para o solvente orgânico e, enfim, para a solução receptora que segue para análise e a fibra oca é descartável. Pode ser utilizada em amostras complexas com partículas (devido a seletividade dos poros da membrana), apresenta alta reprodutibilidade e seletividade, altos fatores de enriquecimento, pouco onerosa e utiliza baixos volumes de solventes tóxicos. Entretanto, como em toda microextração, demanda trabalho operacional minucioso para diminuição dos erros e é de difícil automação.

A Figura 7 representa as etapas da microextração em fase líquida com fibra oca que podem ocorrer de duas formas básicas, através da utilização de duas ou três fases no processo. No caso de duas fases, em um solvente imiscível com a água e imobilizado nos poros da membrana oca, o analito é extraído da amostra aquosa (fase doadora), sendo que para formar a membrana líquida suportada é utilizado o mesmo solvente orgânico no interior da membrana (fase extratora). O extrato orgânico obtido é compatível com cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Por outro lado, utilizando três fases, em um solvente imiscível em água e

imobilizado nos poros da membrana oca (fase orgânica), o analito é extraído da amostra aquosa (fase doadora) para nova fase aquosa (fase receptora) presente no interior da fibra oca. A membrana oca com solvente imiscível em água imobilizado tem como finalidade criar barreira entre a solução receptora e a solução doadora, impedindo que as soluções se misturem. Nesse caso, o extrato aquoso obtido é compatível com HPLC ou eletroforese capilar (MERIB; CARASEK, 2013).

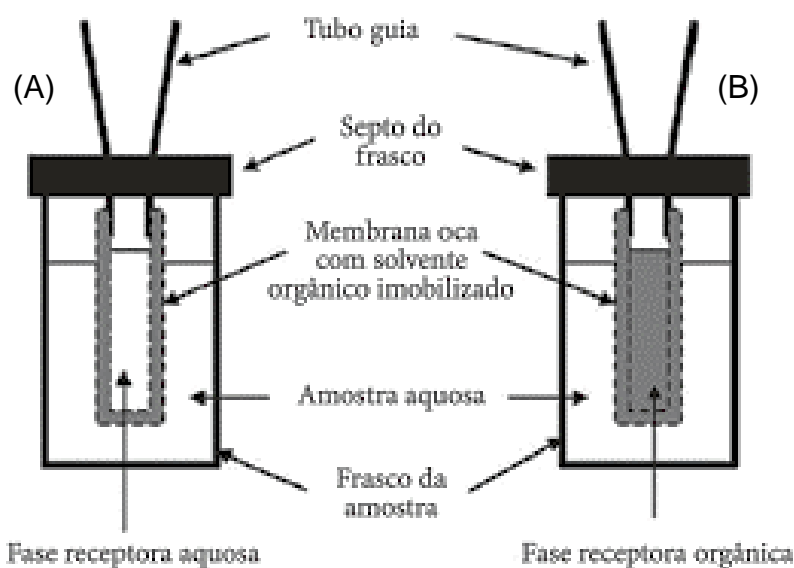


Figura 7. Etapas básicas da microextração em fase líquida com fibra oca, (A) três e (B) duas fases (Fonte: adaptado de MERIB; CARASEK, (2013).

A microextração líquido-líquido dispersiva desenvolvida por Rezaee et al. (2006) atende diversos princípios da química verde, como miniaturização, redução de custo e aumento da rapidez e eficiência de extração, assim como alto potencial para aplicação *in situ*. Trata-se de uma metodologia que utiliza solvente dispersor, miscível no solvente extrator (fase orgânica) e na amostra (fase aquosa), bem como solvente extrator imiscível na fase aquosa, sendo baseada em sistema ternário de solventes (SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010).

Com a injeção rápida da mistura de solventes obtém a dispersão através da formação de diversas microgotas que aumentam a área superficial de contato entre o analito e o solvente extrator, acelerando a ocorrência da partição. Desta forma, aumenta tanto a velocidade da transferência dos analitos da fase aquosa para a fase extratora quanto a obtenção do equilíbrio (REZAEI et al., 2010).

A solubilização dos analitos nas fases depende da polaridade relativa do sistema, uma vez que os analitos apolares apresentam maior afinidade pela fase orgânica (solvente orgânico apolar) do que pela fase aquosa que é polar (HARRIS, 2012). A Figura 8 representa as etapas básicas da microextração líquido-líquido dispersiva.

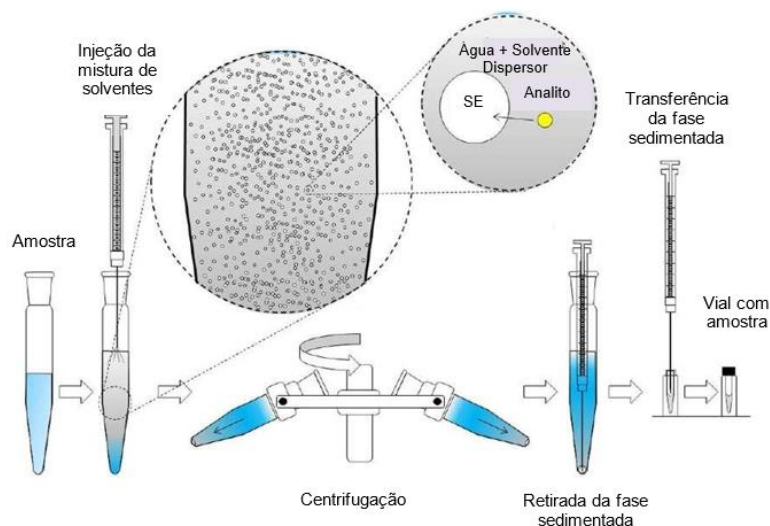


Figura 8. Etapas básicas da microextração líquido-líquido dispersiva (Fonte: adaptado de MARTINS et al., 2012).

A DLLME utiliza solventes extratores com densidade maior que a água, por exemplo, são comumente utilizados hidrocarbonetos halogenados como clorofórmio, diclorometano, clorobenzeno, tetracloreto de carbono e tetracloroetileno. Entretanto, a utilização de solventes menos densos surgiu do interesse em usar solventes menos tóxicos e agressivos ao ambiente e facilitação na separação do extrato, sendo assim foi proposto a abordagem da solidificação da gota orgânica flutuante (SPIETELUN et al., 2014).

A combinação das vantagens que a DLLME apresenta (aumento da área de contato entre o solvente extrator e a amostra) juntamente com os pontos positivos da SFOD (que tem como característica o uso de solventes extratores menos densos que a água, menos tóxicos e que apresentam ponto de fusão na faixa da temperatura ambiente), originou a DLLME-SFOD. Vantagens podem ser ressaltadas como a diminuição da toxicidade do solvente envolvido e do procedimento de separação das duas fases formadas. O procedimento é realizado da forma clássica até a etapa da centrifugação, em seguida a amostra é submetida ao resfriamento em banho de gelo

para solidificação do solvente extrator que depois é facilmente coletado (SPIETELUN et al., 2014). A Tabela 6 ilustra os principais solventes utilizados na DLLME-SFOD e principais características.

Tabela 6. Principais solventes utilizados na DLLME-SFOD e principais características (Fonte: MANSOUR; DANIELSON, 2017).

Solvente	Ponto de fusão (°C)	Ponto de ebulição (°C)	Densidade (g/mL)
1-Dodecanol	22-24	259	0,83
Ácido 1-undecanóico	28,6	284	0,89
1-Undecanol	13-15	243	0,83
2-dodecanol	17-18	249	0,80
Ciclohexanol	25,9	162	0,96
n-hexadecano	18	287	0,77
1-Bromohexadecano	17-18	190	0,99
1-Decanol	6,4	233	0,83

A Tabela 7 apresenta o emprego da DLLME-SFOD na extração de pesticidas em alimentos, água e efluentes. Observa-se o grande potencial de aplicação da DLLME-SFOD em amostras mais complexas, como sucos de frutas (VICHAPONG et al., 2013; LIANG et al., 2013; YOU et al., 2013; YANG et al., 2014; FARAJZADEH et al., 2016); vinho (YOU et al., 2013); cana-de-açúcar (SANAGI et al., 2012) e óleo (PENG et al., 2016) com técnicas de separação HPLC e GC com os mais diversos tipos de detectores (UV; VWD; MS; DAD e ECD). Vantagem destacável é o uso de solventes extratores pouco tóxicos, principalmente 1-dodecanol (YOU et al., 2013; YANG et al., 2014;) e 1-undecanol (LIANG et al., 2013; PENG et al., 2016) com volumes muito baixos (entre 10 e 150 µL). Os solventes dispersores utilizados, mesmo sendo mais tóxicos, como a acetona (PENG et al., 2016) e acetonitrila (SANAGI et al., 2012; FARAJZADEH et al., 2016), foram empregados em baixos volumes (< 2 mL), o que diminui a geração de resíduos tóxicos da análise química.

Tabela 7. Extração de pesticidas com DLLME-SFOD em alimentos, água e efluentes (Fonte: adaptado de MANSOUR; DANIELSON, 2017).

Analito	Amostra	Solvente extrator (µL)	Solvente dispersor (µL)	Técnica Analítica	Resposta linear (µg L⁻¹)	Limite de detecção (µg L⁻¹)	Referência
Herbicidas triazínicos	Água e cana-de-açúcar	1-undecanol (10)	Acetonitrila 100	GC-MS	0,01–100	0,037-0,008	Sanagi et al. (2012)
Pesticidas neonicotinoides	Água e suco de frutas	1-octanol (150)	SDS 0,050 mol L ⁻¹ (50)	HPLC-DAD	---	0,1-0,5	Vichapong et al. (2013).
Fungicidas de estrobilurina	Suco de fruta	1-undecanol	-	HPLC – VWD	5-10000	0,002–0,004	Liang et al. (2013)
Resíduos de fungicidas	Sucos e vinho tinto	1-dodecanol (30)	-	HPLC – DAD	5-1000	0,4-1,4	You et al. (2013)
Inseticidas de benzoilureia	Suco de fruta	1-dodecanol (50)	[P _{14, 6, 6, 6}] PF ₆ (10)	HPLC-VWD	0,5-500	0,03–0,28	Yang et al. (2014)
Inseticidas de benzoilureia	Óleo e lodo de esgoto	1-undecanol (50)	Acetona	HPLC-UV	(2–500) ng/g	(0,08-0,56) ng/g	Peng et al. (2016)
Carbamatos	Suco de frutas e amostras de vegetais	Estearato de di-iso-butil amônio (60)	Acetonitrila (750)	HPLC – DAD	1.09–2000	0,32 – 0,51	Farajzadeh et al. (2016)

GC-MS - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

HPLC-VWD - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de comprimento de onda variável

HPLC-UV - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector UV

HPLC-DAD - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos

GC-ECD - Cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Equipamentos e acessórios

Processador de alimentos (Philco, modelo PH900 turbo), mesa agitadora (Quimis, modelo Q225M), centrífuga refrigerada (Quimis, modelo Q222R) e refrigerador (Electrolux, modelo TF51) foram empregados para o procedimento da DLLME-SFOD.

A separação cromatográfica foi realizada em cromatógrafo a líquido de alta eficiência (Agilent, modelo 1100 Series) com detecção UV e coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 de fase reversa (4,6 mm x 250 mm, 5 μ m).

3.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água deionizada (18,2 M Ω cm a 25 °C).

As soluções de referência de carbamatos 0,01 a 8,0 mg L⁻¹ [carbendazim (TargetMol, T3124, pureza 99,0%) , aminocarb (Riedel-de Haën, 45322, pureza 99,9%), carbofurano (Chem Service, N-11405, pureza 99,5%) e carbaril (Sigma-Aldrich, 32055, pureza 99,9%)] foram preparadas a partir de diluições da solução estoque de 50 mg L⁻¹ preparada em acetonitrila (ACN) (Merck, 1000304000).

Solventes 1-decanol (Sigma-Aldrich, 150584) e ACN (Merck, 1000304000) foram empregados como extrator e dispersor, respectivamente.

ACN (Merck, 1000304000) foi filtrada utilizando membrana de acetato de celulose de 0,45 μ m e desgaseificada em aparelho de ultrassom, antes do emprego no HPLC como fase móvel ACN:H₂O (60:40).

Amostras de frutos foram obtidas em supermercados da cidade de Piracicaba/SP, selecionadas e lavadas em água corrente. A seleção visava separar e excluir frutos que apresentem defeitos visuais. Os frutos foram triturados inteiros, separadamente, em um processador de alimentos e fortificados diariamente com solução de referência de carbamatos.

3.3. Procedimento experimental

A amostra triturada (3,0 g de tomate, maçã ou morango) foi pesada em saco plástico com fecho hermético (7 x 5 cm), dopada com 40 µL de uma solução de referencia de carbamatos e homogeneizada. Em seguida, foram adicionados 10 mL de água deionizada no saco plástico, homogeneizado em mesa agitadora orbital por 5 minutos e o sobrenadante filtrado em membrana de acetato de celulose de 0,45 µm com posterior ajuste de pH para 6,0 (obtenção do extrato da amostra).

Para a extração dos pesticidas, mistura dos solventes extrator (100 µL de 1-decanol) e dispersor (24 µL de acetonitrila) foi adicionada em 308 µL do extrato da amostra em tubo tipo Eppendorf® de 1,5 mL (Etapa 1); agitado por 10 minutos a 200 rpm (Etapa 2); centrifugado em 20 °C, 4000 rpm por 15 minutos (Etapa 3); refrigerado por 15 minutos até solidificação do solvente extrator (Etapa 4) e a fase líquida foi removida com auxílio de uma seringa (Etapa 5). As gotículas do solvente de extração solidificadas foram fundidas rapidamente em temperatura ambiente (Etapa 6), o extrato ressuspensionado com 150 µL de acetonitrila (Etapa 7) e encaminhado para separação/quantificação dos pesticidas no HPLC-UV, conforme esquema da Figura 9.

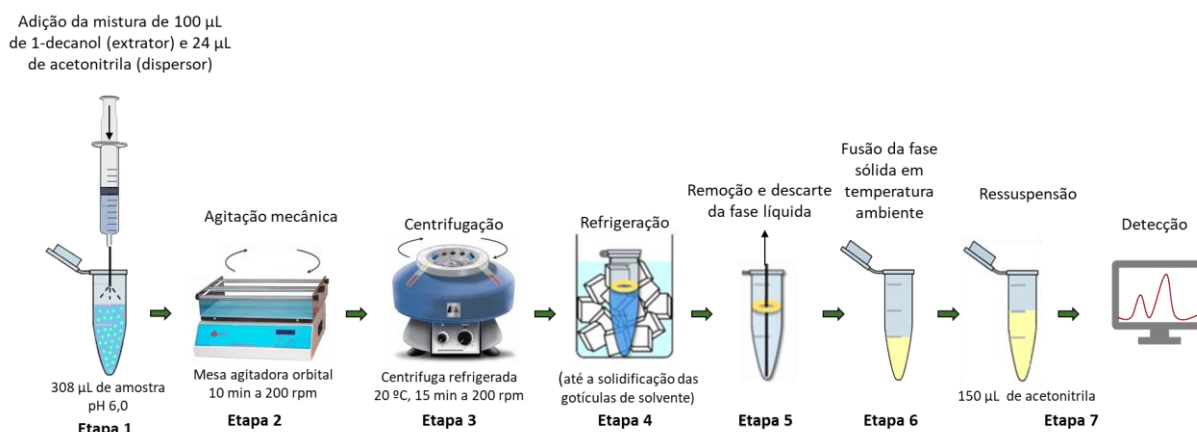


Figura 9. Esquema do procedimento experimental (Fonte: Autor).

3.4. Quantificação dos pesticidas

As condições instrumentais para a quantificação dos analitos foram adaptadas com base no estudo de Basheer et al. (2009) e estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8. Condições cromatográficas empregadas no trabalho desenvolvido (Fonte: Autor).

Fase móvel	ACN, H ₂ O
Proporção fase móvel (modo isocrático) (ACN:H ₂ O)	(60:40)
Vazão	0,8 mL/min
Volume de injeção	30 µL
Temperatura da coluna	25 °C
Tipo de coluna	C18 de fase reversa (4,6 mm x 250 mm - 5 µm)
Deteção	UV 280 nm
Tempo de corrida	17 min

3.5. Análises Estatísticas

Para construção de gráficos e regressões lineares foram empregados Microsoft Excel® e OriginPro 2019b. Para o teste F foi empregado o software GNU Octave 6.0 (Version 6.0.1).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A separação analítica foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com condições cromatográficas descritas na Tabela 8 e tempos de retenção obtidos conforme Figura 10, carbendazim (4,5 min), aminocarb (10,2 min), carbofurano (11,6 min) e carbaril (13,7 min).

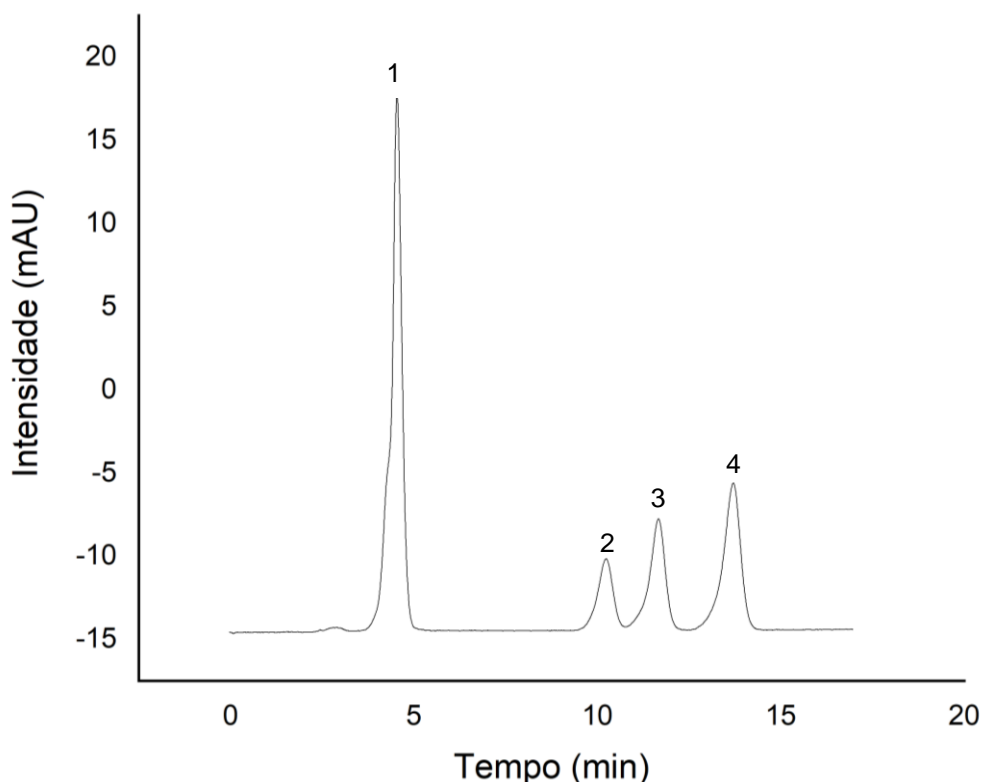


Figura 10. Cromatograma dos carbamatos 8 mg L⁻¹ (1) carbendazim; (2) aminocarb; (3) carbofurano e (4) carbaril.

A partir da Figura 10, foi calculada a resolução entre os picos (2) e (3) e (3) e (4), resultando em 3,3 e 4,4, respectivamente, indicando boa separação, uma vez que a recomendação é que a resolução entre picos vizinhos seja ≥ 2 (SKOOG et al., 2006). Os valores de simetria para cada pico foram obtidos em 1,3; 1,2; 1,4 e 1,4, respectivamente para o carbendazim, aminocarb, carbofurano e carbaril com o integrador do *software* (ChemStation for LC © Agilent Technologies 1990-2003) do equipamento utilizado nas análises cromatográficas.

Na Tabela 9 são apresentadas as equações das retas (concentração em mg L⁻¹), resposta linear, limite de detecção (LD) e os coeficientes de correlação (R²) e de variação (CV) (n=11, 0,75 mg L⁻¹ dos carbamatos) estimados.

Tabela 9. Características analíticas dos pesticidas carbamatos.

Analito	Equação da Reta	Resposta linear (mg L ⁻¹)	R ²	CV (%)	LD (mg L ⁻¹)
Carbendazim	Área do pico = 85,50 C - 1,07	0,04-8,00	0,999	2,3	0,03
Aminocarb	Área do pico = 16,47 C - 2,04	0,5-8,00	0,997	4,9	0,20
Carbofurano	Área do pico = 26,40 C - 2,25	0,08-8,00	0,999	5,2	0,07
Carbaril	Área do pico = 85,78 C - 9,75	0,07-8,00	0,995	3,6	0,06

Observa-se (Tabela 9) que a maior sensibilidade da técnica instrumental utilizada foi atribuída ao carbendazim e ao carbaril com maiores coeficientes angulares, seguidos do carbofurano e por último o aminocarb. O que reflete nos menores LD estimados em 0,03 e 0,06 mg L⁻¹, respectivamente para o carbendazim e carbaril. Atendendo os LMR das amostras estudadas, maçã (2 e 5 mg/kg, respectivamente para o carbaril e carbendazim) e tomate (0,1 mg/kg para o carbaril), estabelecidos pela ANVISA.

O INMETRO estabelece que o valor aceitável para coeficiente de correlação deve ser acima de 0,90, a ANVISA recomenda valor acima de 0,99 (RIBANI et al., 2004). Nesse contexto, observa-se também que os coeficientes de correlação obtidos estão acima de 0,99, atendendo as agências reguladoras.

Para análises de analitos em altas concentrações é permitido coeficiente de variação de até 2%, mas em métodos que quantificam traços, resíduos ou impurezas até 10% é o ideal. Entretanto, dependendo da complexidade da amostra, pode ser aceito até 20% (RIBANI et al., 2004). Os coeficientes de variação estimados para os quatro pesticidas foram menores que 6%, comprovando a precisão das análises cromatográficas.

4.1. Otimização dos parâmetros

Dentre os fatores mais importantes que influenciam a eficiência da DLLME-SFOD estão o tipo e volume do solvente orgânico extrator; o tipo e volume do solvente orgânico dispersor; adição de sal; pH da amostra e tempo de agitação. Também

podem ser otimizados, a etapa de centrifugação (que promove a quebra da emulsão formada e permite a separação do solvente de extração) e o volume de amostra (MANSOUR; DANIELSON, 2017).

O solvente extrator deve ter baixa solubilidade em água e alta solubilidade no solvente dispersivo, densidade menor que a da água; ponto de fusão perto da temperatura ambiente; baixa volatilidade; baixa toxicidade; não deve interferir na medida do analito e ser compatível com os métodos instrumentais (MANSOUR; DANIELSON, 2017). Os solventes avaliados foram 1-decanol e 1-undecanol que atendem aos requisitos da DLLME-SFOD.

De acordo com Caldas et al. (2011), os solventes mais empregados como dispersor na DLLME são acetonitrila, metanol e etanol. Para os ensaios de triagem foram selecionados acetonitrila e etanol.

O tempo de agitação é importante devido ao auxílio na dispersão das gotículas do solvente para a obtenção do equilíbrio de partição entre a gota orgânica e a amostra aquosa. Se o tempo não for suficiente, a extração será prejudicada e, se excessivo, o processo ficará desnecessariamente mais lento (MANSOUR; DANIELSON, 2017).

4.1.1. Análise multivariada

A otimização de alguns parâmetros da DLLME-SFOD foi realizada simultaneamente para os quatro pesticidas, utilizando padrão com concentração final de 0,1 mg L⁻¹ de carbendazim, carbofurano e carbaril e 0,2 mg L⁻¹ de aminocarb. Planejamento fatorial fracionário 2⁸⁻⁴ foi empregado e os ensaios foram baseados em adições e recuperações dos analitos.

4.1.1.1. Triagem

A triagem foi realizada variando em dois níveis (-1 e 1), totalizando 16 ensaios, de acordo com as Tabelas 10 - 12.

Tabela 12. Planejamento fatorial fracionário 2⁸⁻⁴ com valores reais e porcentagens de recuperação dos analitos

Ensaio	Código da Variável								Recuperação (%)			
	1	2	3	4	5	6	7	8	Carbendazim	Aminocarb	Carbofurano	Carbaril
1	1-decanol	Acetonitrila	500	50	10	5	5	2000	72,61	36,27	44,78	48,01
2	2-dodecanol	Acetonitrila	500	50	10	30	30	6000	47,09	49,95	51,24	36,13
3	1-decanol	Etanol	500	50	500	5	30	6000	-	-	-	-
4	2-dodecanol	Etanol	500	50	500	30	5	2000	0	0	50,58	43,15
5	1-decanol	Acetonitrila	4000	50	500	30	30	2000	7,61	4,33	5,01	7,11
6	2-dodecanol	Acetonitrila	4000	50	500	5	5	6000	7,24	4,98	5,92	9,02
7	1-decanol	Etanol	4000	50	10	30	5	6000	19,28	5,02	8,19	14,08
8	2-dodecanol	Etanol	4000	50	10	5	30	2000	15,34	5,85	8,15	15,73
9	1-decanol	Acetonitrila	500	200	500	30	5	6000	-	-	-	-
10	2-dodecanol	Acetonitrila	500	200	500	5	30	2000	0	0	0,00	15,73
11	1-decanol	Etanol	500	200	10	30	30	2000	38,42	29,66	30,02	32,94
12	2-dodecanol	Etanol	500	200	10	5	5	6000	46,01	0	41,23	34,71
13	1-decanol	Acetonitrila	4000	200	10	5	30	6000	0	3,97	3,80	5,06
14	2-dodecanol	Acetonitrila	4000	200	10	30	5	2000	28,80	10,66	13,67	12,95
15	1-decanol	Etanol	4000	200	500	5	5	2000	20,94	8,42	8,63	9,39
16	2-dodecanol	Etanol	4000	200	500	30	30	6000	12,91	6,99	7,64	8,33

Com os resultados das porcentagens de recuperação dos pesticidas estimadas na triagem foi construído gráfico dos efeitos calculados (Figura 11).

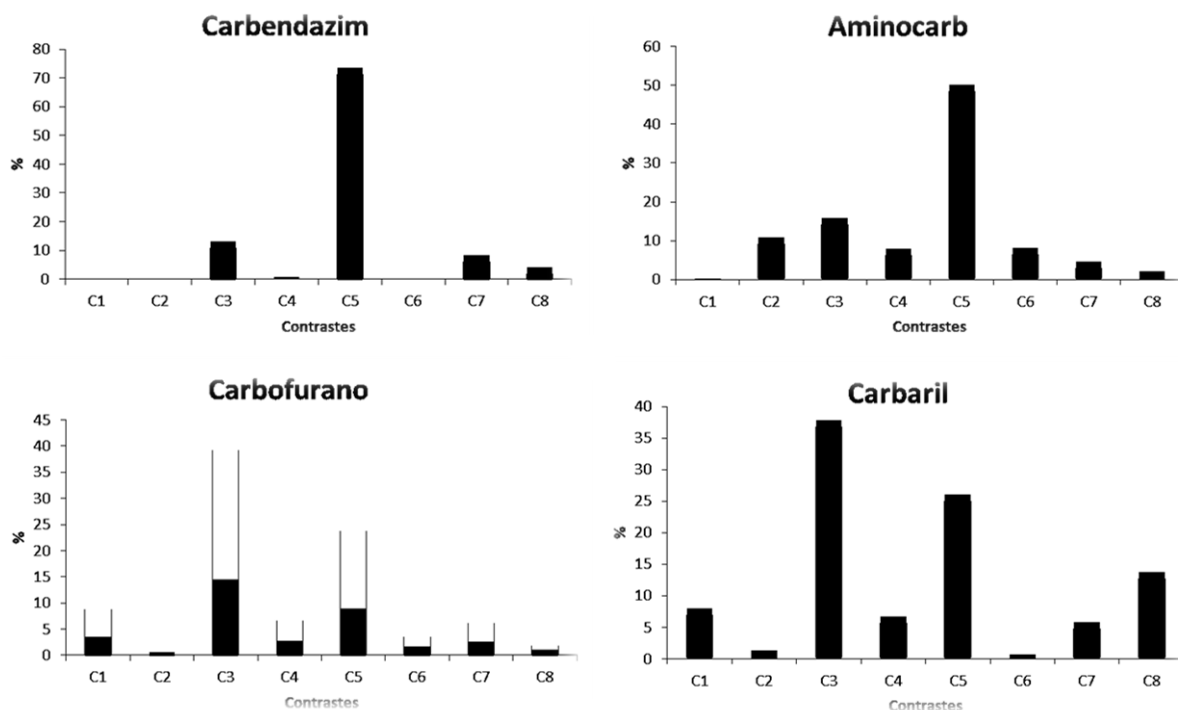


Figura 11. Porcentagem de efeitos dos contrastes das variáveis para os carbamatos. C1: tipo de solvente extrator; C2: tipo de solvente dispersor; C3: volume da amostra (μL); C4: volume de solvente extrator (μL); C5: volume de solvente dispersor (μL); C6: tempo de agitação (min); C7: tempo de centrifugação (min) e C8: velocidade de centrifugação (rpm).

A partir dos resultados obtidos e ilustrados na Figura 11, foram escolhidas as variáveis mais significativas para os quatro pesticidas: volume da amostra (C3), volume de solvente dispersor (C5) e tempo de centrifugação (C7). O volume de solvente dispersor foi a variável mais significativa, pois influencia na dispersão do solvente extrator na amostra, afetando a formação das microgotas, conseqüentemente a extração do analito para o solvente (RAMA et al., 2014; MOREIRA et al., 2014).

4.1.1.2. Ajuste fino

Para o ajuste fino foi proposto planejamento 2^3 com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais, a partir das variáveis significativas para os quatro pesticidas, totalizando

17 ensaios, de acordo com as Tabelas 13 - 15. As demais variáveis ficaram constantes, solvente extrator (50 μL) e dispersor, 1-decanol e acetonitrila, respectivamente; tempo de agitação 10 min e velocidade de centrifugação 4000 rpm.

Tabela 13. Variáveis selecionadas para ajuste fino.

Variáveis	-1,41	-1	0	1	1,41
Volume da amostra (μL)	197	300	550	800	903
Volume de solvente dispersor (μL)	10	20	55	90	100
Tempo de centrifugação (min)	6	15	30	45	51

Tabela 14. Planejamento fatorial 2^3 com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais com valores codificados.

Ensaio	Variável		
	Volume da amostra (μL)	Volume de dispersor (μL)	Tempo de centrifugação (min)
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	-1,41	0	0
13	1,41	0	0
14	0	-1,41	0
15	0	1,41	0
16	0	0	-1,41
17	0	0	1,41

Tabela 15. Planejamento fatorial 2³ com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais com valores reais e porcentagens de recuperação dos analitos.

Ensaio	Variável			Recuperação (%)			
	Volume da amostra (µL)	Volume de dispersor (µL)	Tempo de centrifugação (min)	Carbendazim	Aminocarb	Carbofurano	Carbaril
1	300	20	15	48,25	55,22	47,89	43,25
2	800	20	15	24,50	17,41	17,69	17,26
3	300	90	15	16,20	0,00	0,00	0,00
4	800	90	15	23,97	22,27	24,17	22,86
5	300	20	45	49,03	49,05	46,04	39,47
6	800	20	45	23,13	14,52	17,33	16,65
7	300	90	45	7,66	0,00	0,00	16,58
8	800	90	45	19,47	17,00	18,68	16,75
9	550	55	30	17,78	17,76	15,85	19,34
10	550	55	30	25,09	21,73	22,76	23,08
11	550	55	30	19,90	19,54	16,52	19,04
12	197	55	30	19,09	38,51	37,50	41,13
13	903	55	30	35,50	12,44	12,67	27,74
14	550	10	30	33,70	25,84	23,11	25,76
15	550	100	30	24,09	27,54	23,53	24,34
16	550	55	6	33,26	28,57	32,10	26,93
17	550	55	51	39,73	33,92	32,50	31,77

A partir dos resultados obtidos das porcentagens de recuperação dos pesticidas (Tabela 15), foi empregado teste F para regressão e resíduo e para a falta de ajuste e erro puro para cada pesticida (Figuras 12-15).

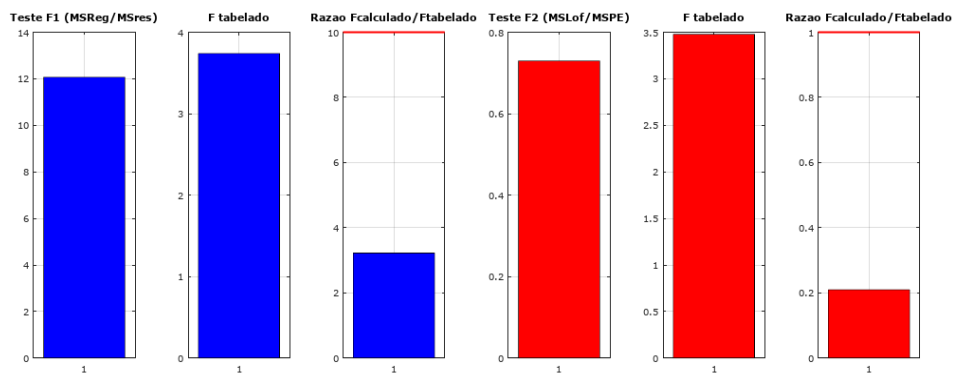


Figura 12. Carbendazim - Teste F para a média quadrática da regressão e do resíduo (azul) e para a média quadrática da falta de ajuste e do erro puro (vermelho).

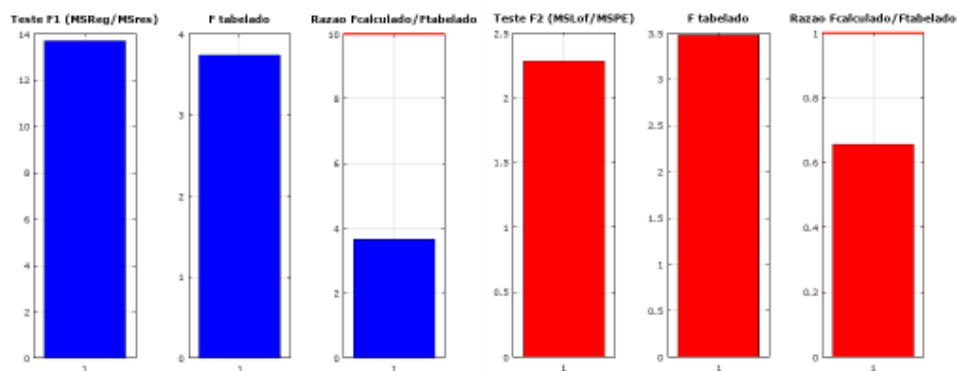


Figura 13. Aminocarb - Teste F para a média quadrática da regressão e do resíduo (azul) e para a média quadrática da falta de ajuste e do erro puro (vermelho).

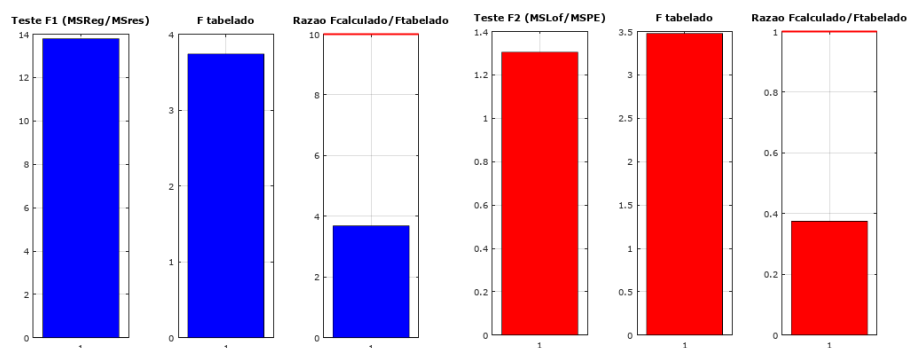


Figura 14. Carbofurano - Teste F para a média quadrática da regressão e do resíduo (azul) e para a média quadrática da falta de ajuste e do erro puro (vermelho).

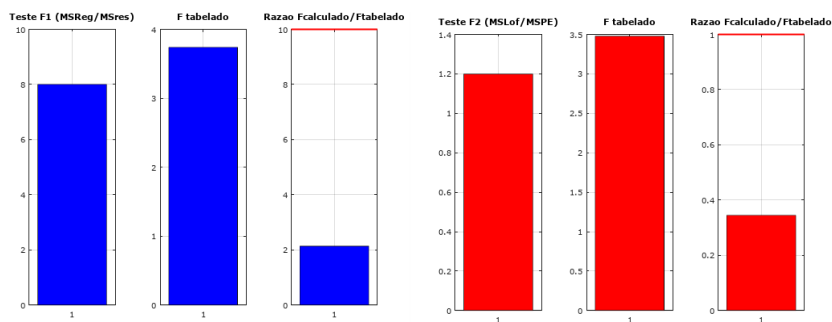


Figura 15. Carbaril - Teste F para a média quadrática da regressão e do resíduo (azul) e para a média quadrática da falta de ajuste e do erro puro (vermelho).

A partir das Figuras 12 – 15, foi observado que a razão entre o F calculado e o F tabelado se manteve abaixo de 10 e a falta de ajuste abaixo de 1, demonstrando a adequação do experimento realizado. Com base na análise de variância foi possível gerar os coeficientes de regressão (Figura 16).

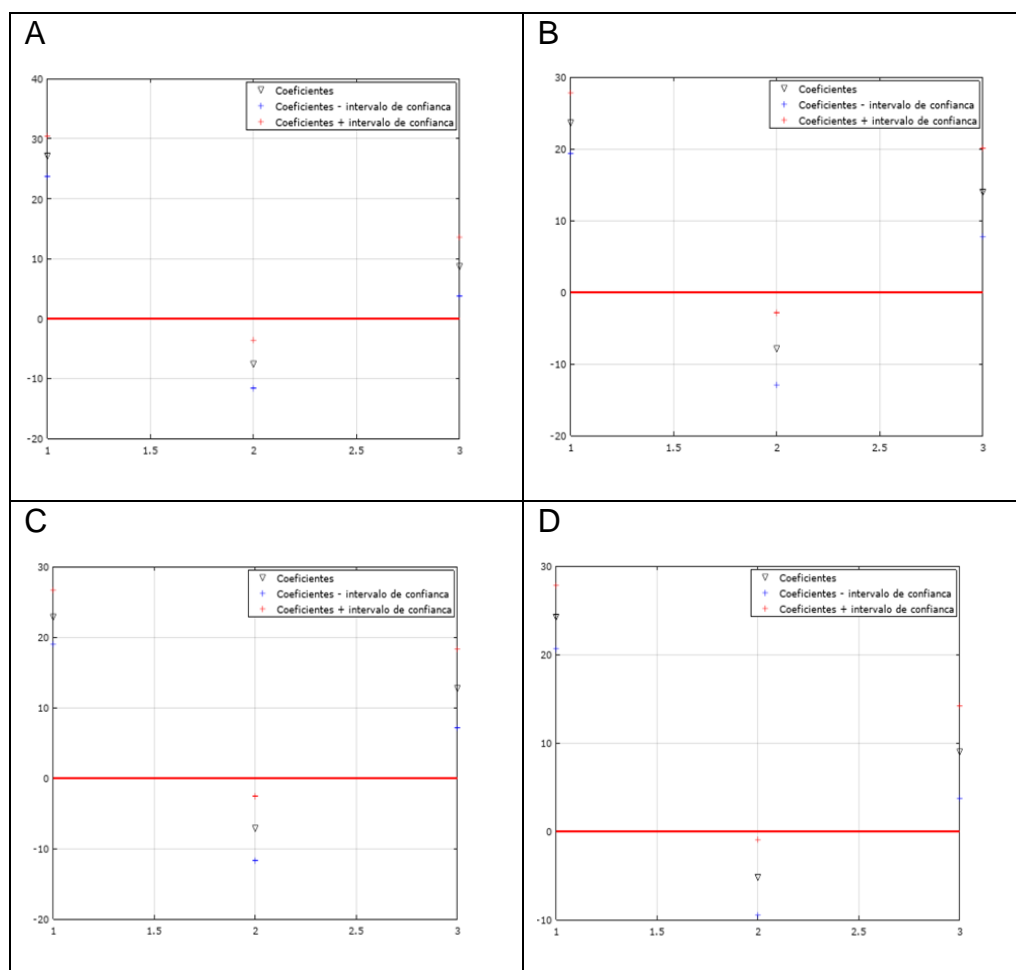


Figura 16. Coeficientes de regressão, 1. Constante; 2. Volume de solvente dispersor; 3. Interação entre os volumes de solvente dispersor e da amostra. (A) Carbendazim; (B) Aminocarb; (C) Carbofurano e (D) Carbaril.

Conforme Figura 16, para os quatro pesticidas estudados, os coeficientes significativos foram volume de solvente dispersor e a interação entre os volumes de solvente dispersor e da amostra. A partir das variáveis significativas, os gráficos de superfície e de contorno foram gerados (Figuras 17 e 18).

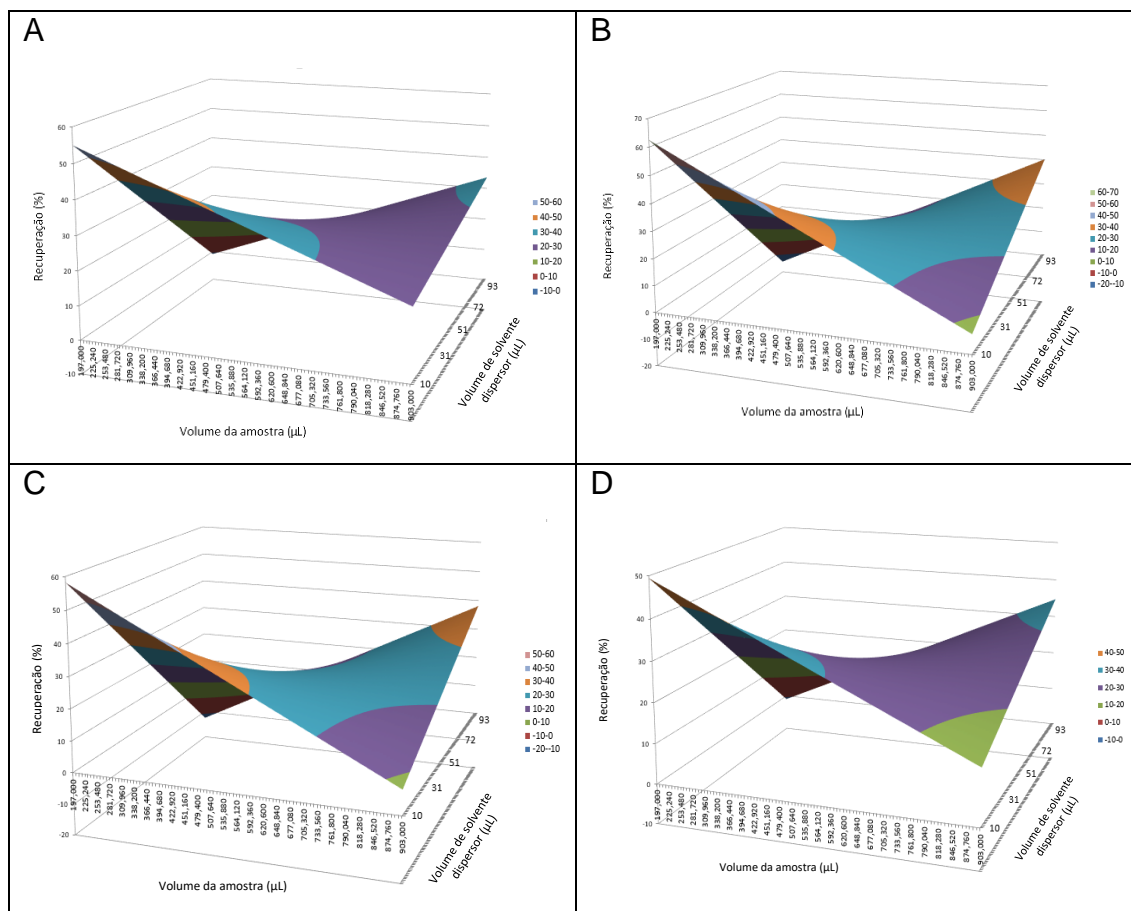


Figura 17. Gráficos de superfície de resposta (ajuste fino). (A) Carbendazim; (B) Aminocarb; (C) Carbofurano e (D) Carbaril.

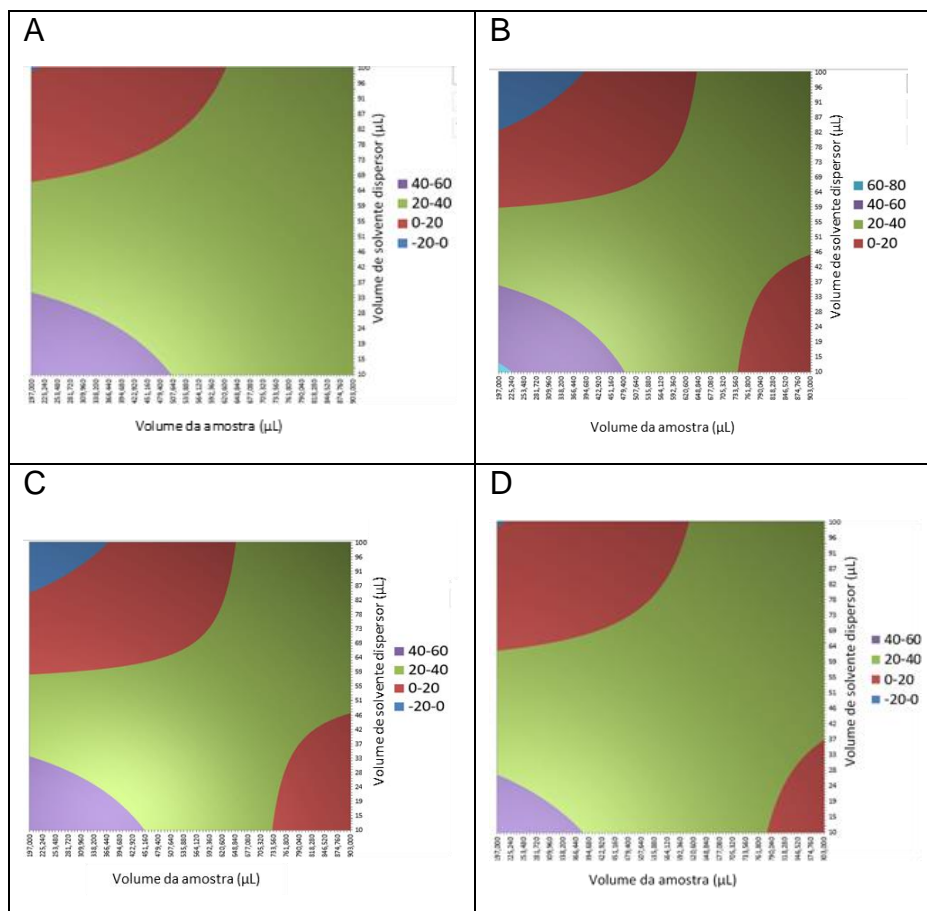


Figura 18. Gráficos de contorno (ajuste fino). (A) Carbendazim; (B) Aminocarb; (C) Carbofurano e (D) Carbaril.

A partir dos gráficos de superfície de resposta (Figura 17) e de contorno (Figura 18), as maiores recuperações dos quatro pesticidas estudados serão alcançadas em 40 – 60% para carbendazim, carbofurano e carbaril e em 60 – 80% para aminocarb, próximo ao mínimo volume de solvente dispersor e da amostra. Sendo assim, foi realizado o teste de extrapolação para encontrar o ponto máximo de recuperação (%).

4.1.1.3. Caminho de ascendência ao máximo

O caminho de ascendência ao máximo foi realizado, a partir do melhor resultado observado no planejamento do ajuste fino, variando os volumes de solvente dispersor e da amostra, no total de 5 ensaios. As demais variáveis ficaram constantes, solvente extrator (50 μL) e dispersor, 1-decanol e acetonitrila, respectivamente; tempo de agitação 10 min e tempo e velocidade de centrifugação, respectivamente 15 min e

4000 rpm. Na Tabela 16 são apresentados os ensaios realizados com as variáveis reais e os resultados obtidos de porcentagens de recuperação para os quatro pesticidas.

Tabela 16. Caminho de ascendência ao máximo com valores reais e porcentagens de recuperação dos analitos.

Ensaio	Variável		Recuperação (%)			
	Volume da amostra (µL)	Volume de dispersor (µL)	Carbendazim	Aminocarb	Carbofurano	Carbaril
1	210	10	60,59	65,75	59,22	65,53
2	170	20	45,92	66,07	50,35	66,51
3	130	30	37,16	60,33	49,16	65,16
4	90	40	-	-	-	-
5	50	50	-	-	-	-

As maiores recuperações para os quatro pesticidas foram estimadas em torno de 60% (Tabela 16) quando o ensaio 1 foi empregado com volumes da amostra e de solvente dispersor de 210 e 10 µL, respectivamente. Diminuindo o volume da amostra até 130 µL e aumentando o volume de solvente dispersor até 30 µL, as porcentagens de recuperação foram as menores devido a diminuição do fator de pré-concentração. Abaixo destes volumes, não foram observadas respostas analíticas.

4.1.1.4. Robustez

A robustez em torno do melhor resultado foi avaliada em planejamento 2^2 com 3 pontos centrais e 4 pontos axiais, totalizando 11 ensaios, de acordo com as Tabelas 17-19. As demais variáveis ficaram constantes, solvente extrator (50 µL) e dispersor, 1-decanol e acetonitrila, respectivamente; tempo de agitação 10 min e tempo e velocidade de centrifugação, respectivamente 15 min e 4000 rpm.

Tabela 17. Planejamento da robustez em torno do melhor resultado.

Variáveis	-1,41	-1	0	1	1,41
Volume da amostra (μL)	154	170	210	240	256
Volume de solvente dispersor (μL)	7	8	10	12	13

Tabela 18. Planejamento fatorial 2^2 com 3 pontos centrais e 4 pontos axiais com valores codificados.

Ensaio	Variável	
	Volume da amostra (μL)	Volume de solvente dispersor (μL)
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	-1,41	0
9	0	-1,41
10	1,41	0
11	0	1,41

Tabela 19. Planejamento fatorial 2^2 com 3 pontos centrais e 4 pontos axiais com valores reais e porcentagens de recuperação dos analitos.

Ensaio	Volume da amostra (μL)	Volume de dispersor (μL)	Recuperação (%)			
			Carbendazim	Aminocarb	Carbofurano	Carbaril
1	170	12	55,35	70,97	67,25	65,28
2	240	12	49,42	47,83	51,87	50,73
3	170	8	49,81	73,88	59,56	61,70
4	240	8	37,97	63,39	46,94	45,12
5	210	10	51,25	64,34	55,21	53,75
6	210	10	34,60	71,72	47,22	45,06
7	210	10	51,65	64,02	52,02	47,42
8	154	10	50,60	97,29	65,86	62,51
9	210	13	56,11	72,01	60,77	52,46
10	256	10	26,68	39,84	0,00	37,56
11	210	7	43,13	48,14	45,26	49,14

Os gráficos de superfície e de contorno foram gerados a partir das porcentagens de recuperação (Tabela 19) para os quatro pesticidas (Figuras 19 e 20).

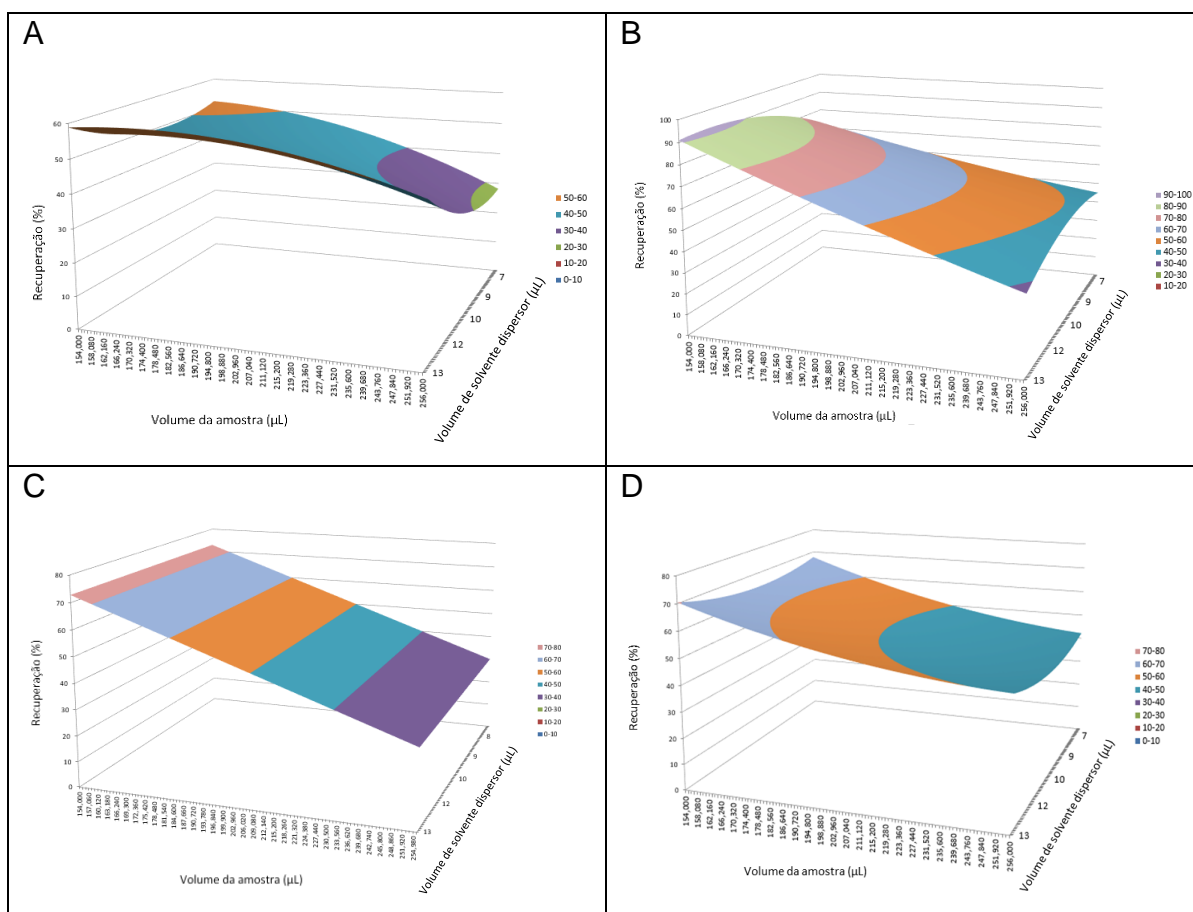


Figura 19. Gráficos de superfície de resposta (robustez). (A) Carbendazim; (B) Aminocarb; (C) Carbofurano e (D) Carbaril.

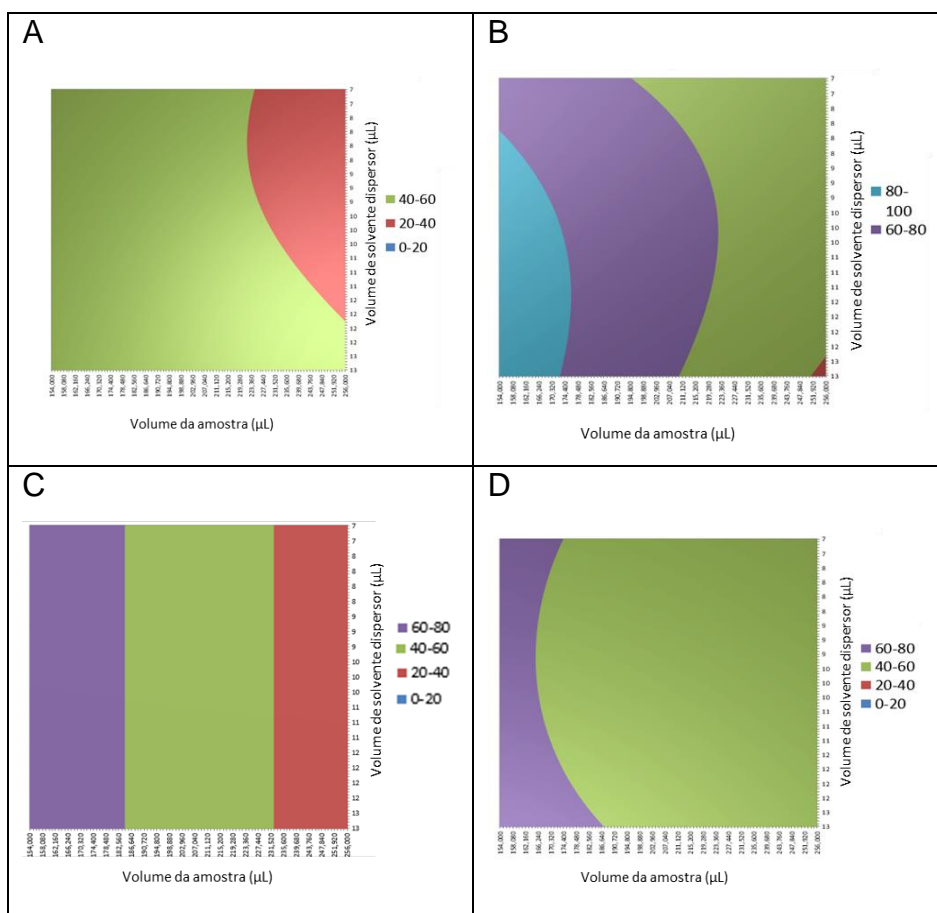


Figura 20. Gráficos de contorno (robustez). (A) Carbendazim; (B) Aminocarb; (C) Carbofurano e (D) Carbaril.

Conforme os gráficos de superfície de resposta (Figura 19) e de contorno (Figura 20), o ponto máximo de recuperação dos pesticidas pode ser encontrado a partir dos modelos propostos nas Equações 1 a 4, respectivamente para carbendazim, aminocarb, carbofurano e carbaril.

$$\text{Recuperação carbendazim (\%)} = 45,82 - 6,46v_1 - 4,43v_2 - 2,60v_1^2 + 2,92v_2^2 - 1,47v_{12} \quad (1)$$

$$\text{Recuperação aminocarb (\%)} = 66,69 + 14,37v_1 - 1,90v_2 + 0,87v_1^2 - 3,40v_2^2 + 3,16v_{12} \quad (2)$$

$$\text{Recuperação carbofurano (\%)} = 51,43 - 15,15v_1 \quad (3)$$

$$\text{Recuperação carbaril (\%)} = 52,90 + 10,92v_1 - 8,40v_1^2 - 5,94v_2^2 + 0,10v_{12} \quad (4)$$

Onde v_1 é o volume da amostra (μL); v_2 é o volume de solvente dispersor (μL) e v_{12} é a interação das variáveis 1 e 2.

As maiores porcentagens de recuperação dos quatro pesticidas foram encontradas com os volumes da amostra e de solvente dispersor de 154 e 12 μL , respectivamente. Como estes são muito baixos e difíceis de manipular, mantendo a

devida proporção, os volumes foram dobrados em 308 e 24 μL , respectivamente para amostra e solvente dispersor. Nestas condições, as porcentagens de recuperação previstas pelo modelo e as obtidas experimentalmente ($n = 11$) estão listadas na Tabela 20.

Tabela 20. Porcentagens de recuperação previstas e obtidas experimentalmente para os analitos.

Recuperação	Carbendazim	Aminocarb	Carbofurano	Carbaril
Prevista (%)	56,4%	91%	72%	68%
Experimental (%, $n = 11$)	49,6 \pm 4,3	64,6 \pm 4,1	60,4 \pm 2,7	62,3 \pm 1,6

4.1.2. Análise univariada

A otimização de outros parâmetros que podem afetar a eficiência da DLLME-SFOD foi realizada individualmente para os quatro pesticidas, utilizando padrão com concentração final de 0,1 mg L^{-1} de carbendazim, carbofurano e carbaril e 0,2 mg L^{-1} de aminocarb.

4.1.2.1. Efeito da adição de sal

O efeito *salting out* é caracterizado pela diminuição da solubilidade dos analitos na amostra aquosa devido ao aumento da força iônica causado pela adição de sal, facilitando a partição do analito para a fase orgânica e, conseqüentemente, o desempenho da extração (ZHOU; FANG, 2015). Os sais selecionados para o estudo de adição e recuperação dos quatro pesticidas foram acetato de sódio, cloreto de sódio, sulfato de sódio e cloreto de potássio em concentrações entre 0,5 e 2,0% (m/v). Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 21 e comparados com os resultados sem adição de sal.

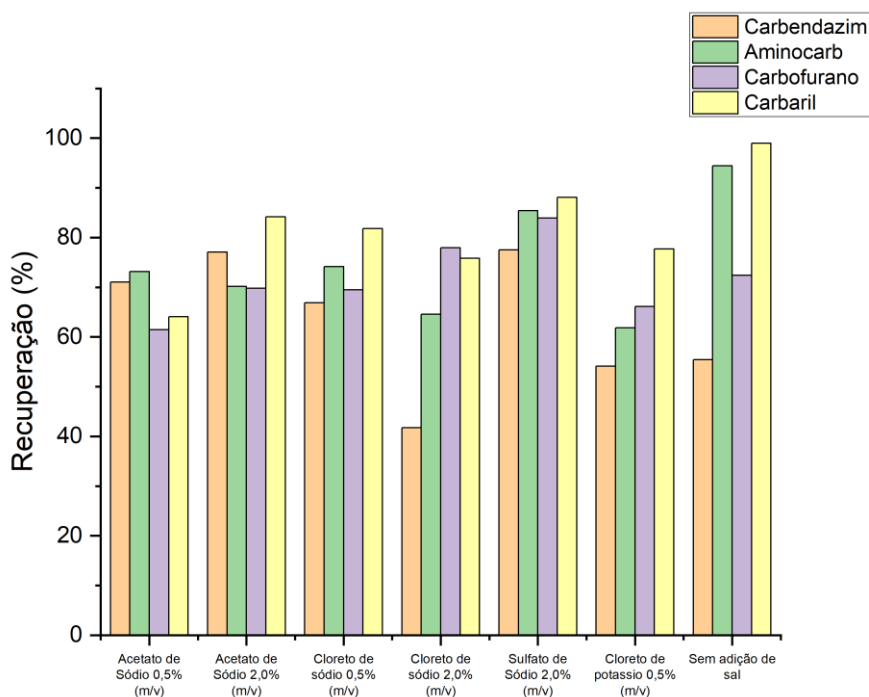


Figura 21. Efeito da adição de sal sob as porcentagens de recuperação dos analitos.

Conforme observado na Figura 21, as porcentagens de recuperação não apresentaram diferenças significativas variando o tipo do sal empregado no efeito *salting out* (em média > 60%). O teste t para amostras independentes (ou não pareadas), nível de significância 0,05 e teste bicaudal, foi aplicado para comparar as maiores porcentagens de recuperação para os quatro pesticidas com adição de sulfato de sódio 2% (m/v) e sem adição de sal, resultados estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21. Teste t aplicado para amostras independentes no estudo da adição de sal.

	Recuperação (%)		Teste t para amostras independentes		
	Sulfato de sódio 2,0% (m/v)	Sem adição de sal	t calculado	Valor p	Resultado
Carbendazim	77,51	55,39	1,11	0,38	não é significativo em p <0,05
Aminocarb	85,43	94,42	-0,12	0,92	não é significativo em p <0,05
Carbofurano	83,92	72,43	1,98	0,19	não é significativo em p <0,05
Carbaril	88,06	98,96	-1,22	0,35	não é significativo em p <0,05

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 21, não há diferença significativa entre os tratamentos (com e sem adição de sal) em $p < 0,05$. Desta forma, a adição de sal foi descartada, evitando mais uma etapa no preparo da amostra, diminuindo o consumo de reagentes e custo das análises.

4.1.2.2. Efeito do pH da amostra

O pH da amostra pode afetar a eficiência da extração em diferentes níveis. Se o analito for ionizável, a quantidade extraída dependerá do grau de ionização que é fortemente dependente do pH. Quando o pH da amostra é menor que o pKa do analito, o analito estará predominantemente na forma protonada (HARRIS, 2012).

Os valores de pKas para os quatro pesticidas são 4,53 (MAZELLIER et al., 2003); 11,92 (BOUJELBANE; HAMIDA, 2010); 14,76 (OMENA et al., 2019) e 10,4 (FAO, 2007) para carbendazim, aminocarb, carbofurano e carbaril, respectivamente.

O estudo foi realizado ajustando o pH antes da DLLME-SFOD nos valores de 3; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 13. Os resultados estão apresentados na Figura 22.

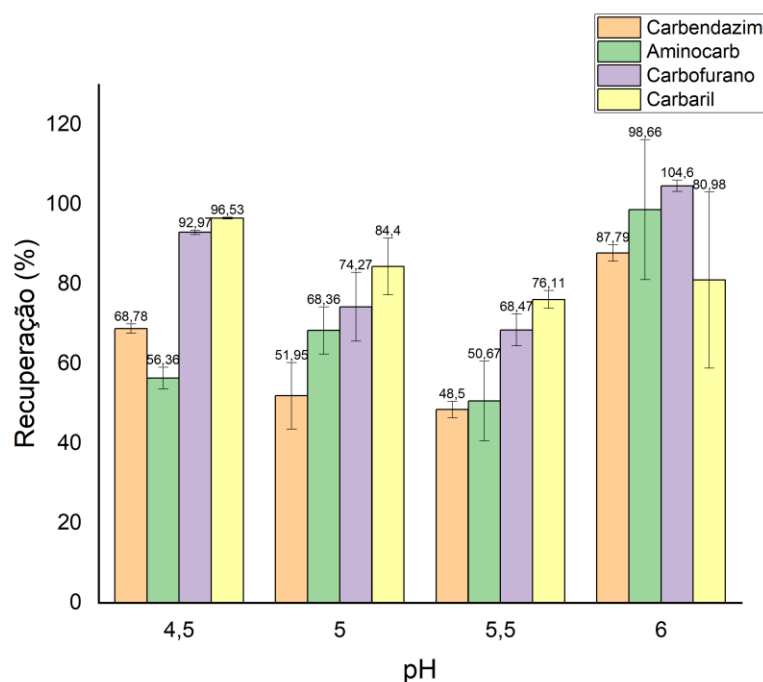


Figura 22. Efeito do pH da amostra sob as porcentagens de recuperação dos analitos.

Não foram observados sinais analíticos para os dois extremos de pH estudados (3 e 13). As maiores porcentagens de recuperação (> 80%) foram estimadas para o pH 6 que apresentaram valores até 2 vezes maiores em comparação com pH 5,5. Em razão disso e dos extratos dos frutos apresentarem discrepâncias quanto a acidez, o ajuste de pH em 6 foi realizado nas soluções das análises.

4.2. DLLME-SFOD

Os parâmetros analisados, as faixas estudadas, bem como os valores selecionados na otimização experimental estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22. Parâmetros otimizados da DLLME-SFOD para extração de quatro pesticidas carbamatos.

Parâmetros analisados	Estudado	Selecionado
Tipo de solvente extrator	1-decanol e 1-undecanol	1-decanol
Tipo de solvente dispersor	Acetonitrila e Etanol	Acetonitrila
Volume da amostra (µL)	50-4000	308
Volume de solvente extrator (µL)	50-200	100
Volume de solvente dispersor (µL)	7-500	24
Tempo de agitação (min)	5-30	10
Tempo de centrifugação (min)	5-30	15
Velocidade de centrifugação (rpm)	2000-6000	4000

A metodologia de extração proposta (DLLME-SFOD) para quatro pesticidas carbamatos em amostras de frutos é eficiente com recuperações entre 80 – 104% como outras metodologias de preparo de amostras descritas na literatura (Tabela 23).

Vantagens podem ser destacadas, dentre elas, menor quantidade de amostra por determinação (0,3 mL); cerca de 13 vezes menor que o empregado na LLE-LTP, 4 mL (SILVÉRIO et al., 2012).

O uso de solventes mais baratos, menos tóxicos e com volume reduzido também são destacáveis. Uma vez que os volumes utilizados foram os menores para os dois solventes extrator (100 µL) e dispersor (24 µL) com reduções de 65; 240; 8,4 e 120 vezes, respectivamente em comparação com LLE-LTP (SILVÉRIO et al., 2012); SFE (BARRIONUEVO; LANÇAS, 2001); DLLME (TANKIEWICZ; BIZIUK, 2017) e QuEChERS (AOAC, 2007). Dos solventes empregados, o 1-decanol é menos tóxico que hexano (utilizado na EFS) e o tetracloroetileno (utilizado na DLLME) e mais barato

que os solventes do método QuEChERS. Além disso, tanto a EFS quanto o QuEChERS exigem outros insumos como cartucho e PSA que encarecem os procedimentos.

O procedimento proposto emprega baixas quantidades de amostra e solventes orgânicos, reduzindo a geração de resíduos o que se alinha aos princípios da química analítica verde, sendo excelente ferramenta no preparo de amostras de frutos *in natura*, além de boa ferramenta limpa para a etapa do preparo de amostras.

Tabela 23. Procedimentos de extração de pesticidas empregados em amostras de alimentos.

	DLLME-SFOD	LLE-LTP	SPE	DLLME	QuEChERS
Amostras	Morango, maçã e tomate	Água	Água	Água	Uvas, alfaces e laranjas
Analitos	Carbamatos	Clorpirifós, λ -cialotrina, permetrina e bifentrina	Piretróides	34 pesticidas	20 pesticidas
Quantidade de amostra	308 μ L	4 mL	100 mL	10 mL	15 g
Solventes extrator / dispersor	1-decanol/Acetonitrila	Acetonitrila	Hexano/Acetonitrila	Tetracloroetileno/metanol	Acetonitrila com 1% de ácido acético
Volumes de solventes extrator / dispersor	100 μ L/24 μ L	8 mL	10 mL/20 mL	40 μ L/1,0 mL	15 mL
Outros insumos			Cartucho de SPE		Acetato de sódio (1,5 g), sulfato de magnésio (6,15) g, PSA (50 mg/mL)
Detecção	HPLC-UV	GC-MS	GC-ECD	GC-MS	GC-MS ou LC-MS
Referência	Este trabalho	Silvério et al. (2012)	Barrionuevo; Lanças (2001)	Tankiewicz; Biziuk (2017)	AOAC (2007)

DLLME-SFOD - Microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante

LLE-LTP - Extração líquido-líquido com partição de baixa temperatura

SFE - Extração em fase sólida

DLLME - Microextração líquido-líquido dispersiva

QuEChERS – Método rápido, fácil barato eficaz robusto e seguro

4.3. Análises de amostras de frutos *in natura*

Estudo de adição e recuperação foram realizados em amostras de frutos *in natura* (tomate, morango e maçã) fortificadas com 0,1 mg L⁻¹ de carbendazim, carbofurano e carbaril e 0,2 mg L⁻¹ de aminocarb. Os resultados em porcentagens de recuperação são apresentados na Tabela 24.

Tabela 24. Estudo de adição e recuperação dos analitos em amostras de fruto *in natura* (n = 3).

	Recuperação (%)			
	Carbendazim	Aminocarb	Carbofurano	Carbaril
Tomate	101,7±9,4	80,2±3,5	88,5±0,9	87,79±0,5
Morango	78,0±3,1	66,4±3,9	65,5±1,6	76,46±3,0
Maçã	68,2±5,3	79,5±1,6	75,5±0,5	86,7±3,2

Os resultados das análises dos pesticidas nos frutos, apresentaram recuperações entre 66 e 102% e desvios aceitáveis (< 10%), demonstrando a viabilidade da metodologia desenvolvida. Não foram encontrados os pesticidas pesquisados nas amostras avaliadas.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram a viabilidade do procedimento proposto, baseado na DLLME-SFOD para a extração simultânea dos pesticidas carbendazim, aminocarb, carbofurano e carbaril de amostras de frutos *in natura* (66 e 102% e desvios aceitáveis).

Limites de detecção e quantificação, bem como as demais características analíticas, atendem os estabelecidos pelas agências reguladoras para quantificação de pesticidas em alimentos, no Brasil.

A DLLME-SFOD é uma metodologia de preparo de amostra limpa e apresenta diversas vantagens como operação simples, rápida, de baixo custo, empregando mínima quantidade de solventes orgânicos, reduzindo risco de danos ao meio ambiente e ao analista, atendendo os preceitos da química analítica verde. Além disso, apresenta grande potencial para aplicação em outros tipos de frutos e com foco em outros carbamatos, uma vez que possuem o mesmo grupo químico.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. C24 – Carbendazim. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/c/4227json-file-1/view>>. Acesso em: 28/11/2020a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. C06 – Carbofurano. Disponível em: <<http://antigo.anvisa.gov.br/documents/111215/0/C06+-+Carbofurano+-+a+partir+de+18.04.2018+-+CREAV.pdf/72d99006-6add-4d53-ac6e-57beeac2146a>>. Acesso em: 30/11/2020b.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. C03 – Carbaril . Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/c/4219json-file-1/view>>. Acesso em: 28/11/2020c.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Termina prazo de descontinuação do uso de Carbofurano. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2018/termina-prazo-de-descontinuacao-do-uso-de-carbofurano>>. Acesso em: 30/11/2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos - Relatório 2017 e 2018. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-de-agrotoxicos-relatorio-2017-e-2018.pdf/view>>. Acesso em: 28/11/2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Anvisa inicia a reavaliação do carbendazim. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/anvisa-inicia-a-reavaliacao-do-carbendazim>>. Acesso em: 30/11/2020a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Agrotóxicos em alimentos . Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/perguntasfrequentes/agrotoxicos/agrotoxicos-em-alimentos/agrotoxicos-em-alimentos>>. Acesso em: 7/12/2020b.

ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green Chemistry: Principles and Practice. , 2009. Disponível em: <www.rsc.org/csr>. Acesso em: 30/11/2020.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; ŠTAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412–431, 2003. AOAC International.

AOAC. **Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (AOAC Official Method 2007.01 - First Action 2007)**. 2007.

ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Green Analytical Chemistry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 497–511, 2008. Elsevier.

BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Solid-phase extraction (SPE) and solid-phase microextraction of pyrethroids in water. **Quimica Nova**, v. 24, n. 2, p. 172–175, 2001. Sociedade Brasileira de Química.

BASHEER, C.; ALNEDHARY, A. A.; RAO, B. S. M.; LEE, H. K. Determination of carbamate pesticides using micro-solid-phase extraction combined with high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 2, p. 211–216, 2009. Elsevier.

BOUJELBANE, F.; HAMIDA, N. BEN. ÉTUDE CINÉTIQUE PAR HPLC/UV DE LA DÉGRADATION D'UN CARBAMATE INSECTICIDE L'AMINOCARB EN MILIEU AQUEUX. **Journal de la Société Chimique de Tunisie**, v. 12, p. 43–51, 2010. Disponível em: <http://www.sctunisie.org/pdf/JSCT_v12-7.pdf>. Acesso em: 28/11/2020.

BRASIL. **Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002**. Brasília, 2002.

CALDAS, L. Q. DE A. **INTOXICAÇÕES EXÓGENAS AGUDAS POR CARBAMATOS, ORGANOFOSFORADOS, COMPOSTOS BIPYRIDÍLICOS E PIRETRÓIDES**. 2000.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; et al. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Quimica Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604–1617, 2011. SBQ. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422011000900021&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 28/11/2020.

CANTARUTTI, T. F. P.; ARAÚJO, S. L. DE; ROSSI, S. C.; DALSENTER, P. R. RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM ALIMENTOS. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 18, n. 0, p. 9–16, 2008. Universidade Federal do Paraná. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/pesticidas/article/view/13371>>. Acesso em: 29/11/2020.

CESARINO, I.; GALESCO, H. V.; MORAES, F. C.; LANZA, M. R. V.; MACHADO, S. A. S. Biosensor Based on Electrodeposition of Carbon Nanotubes/Polypyrrole/Laccase for Neurotransmitter Detection. **Electroanalysis**, v. 25, n. 2, p. 394–400, 2013.

COUTINHO, C. F. B.; GALLI, A.; MAZO, L. H.; MACHADO, S. A. S. CARBENDAZIM E O MEIO AMBIENTE: DEGRADAÇÃO E TOXIDAZ. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 16, 2006. Universidade Federal do Paraná.

DIÁRIO AGRÍCOLA AGROPLANNING. Frutas e vegetais com maiores teores de pesticidas - . Disponível em: <<https://www.agroplanning.com.br/2020/07/27/frutas-e-vegetais-com-maiores-teores-de-pesticidas/>>. Acesso em: 8/12/2020.

ESRAFILI, A.; YAMINI, Y.; SHARIATI, S. Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of some antidepressant drugs in biological fluids. **Analytica Chimica Acta**, v. 604, n. 2, p. 127–133, 2007. Elsevier.

FAO. FAO Specifications and Evaluations for Agricultural Pesticides - CARBARYL. **Fao**, p. 1–62, 2007.

FARAJZADEH, M. A.; BAMOROWAT, M.; AFSHAR MOGADDAM, M. R. Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of a floating ionic liquid for extraction of carbamate pesticides from fruit juice and vegetable samples. **RSC Advances**, v. 6, n. 114, p. 112939–112948, 2016. Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/ra/c6ra20103b>>. Acesso em: 28/11/2020.

FERRUCIO, B. **Avaliação de melanócitos humanos expostos ao inseticida carbaril e à radiação solar em cultura**, 5. mar. 2015. São Paulo: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9141/tde-28052015-085252/>>. Acesso em: 30/11/2020.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Estudo revela que Brasil é um dos países mais eficientes no uso da terra e insumos agrícolas em função de sua alta produção | FAO no Brasil | Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/en/c/1070557/>>. Acesso em: 10/11/2020.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 8ª Edição ed. 2012.

HOSPITAL ESTADUAL DE JARAGUÁ - HEJA. Anvisa divulga lista dos alimentos mais contaminados por agrotóxicos. Disponível em: <<https://heja.org.br/noticias/anvisa-divulga-lista-dos-alimentos-mais-contaminados-por-agrotoxicos/>>. Acesso em: 8/12/2020.

KHALILI ZANJANI, M. R.; YAMINI, Y.; SHARIATI, S.; JÖNSSON, J. Å. A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop. **Analytica Chimica Acta**, v. 585, n. 2, p. 286–293, 2007. Anal Chim Acta. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17386676/>>. Acesso em: 30/11/2020.

LAZZERI, T. Agrotóxicos: Brasil libera quantidade até 5 mil vezes maior do que Europa. Disponível em: <<https://reporterbrasil.org.br/2017/11/agrotoxicos-alimentos-brasil-estudo/>>. Acesso em: 10/11/2020.

LEONG, M. I.; HUANG, S. DA. Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1211, n. 1–2, p. 8–12, 2008. Elsevier.

LIANG, P.; LIU, G.; WANG, F.; WANG, W. Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction with solidification of floating organic droplet followed by high performance liquid chromatography for the determination of strobilurin fungicides in fruit juice samples. **Journal of Chromatography B**, v. 926, p. 62–67, 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023213001074>>. Acesso em: 30/11/2020.

MANSOUR, F. R.; DANIELSON, N. D. Solidification of floating organic droplet in dispersive liquid-liquid microextraction as a green analytical tool. **Talanta**, v. 170, p. 22–35, 2017. Elsevier B.V.

MARTINS, M. L.; GILBERTO PRIMEL, E.; SOUZA CALDAS, S.; et al. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p. 35–51, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4322/sc.2012.004>>. Acesso em: 30/11/2020.

MAZELLIER, P.; LEROY, E.; LAAT, J. DE; CHEMISTRY, B. L.-E.; 2003, U. Degradation of carbendazim by UV/H₂O₂ investigated by kinetic modelling. **Springer**, 2003. Disponível em: <<http://labo.univ-poitiers.fr/lcee>>. Acesso em: 28/11/2020.

MEIRA, A. P. G. Técnicas de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal: uma revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 22, n. 2, p. 766, 2015. Universidade Estadual de Campinas. Disponível em: <<https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/san/article/view/8642508>>. Acesso em: 30/11/2020.

MENCK, V. F.; COSSELLA, K. G.; OLIVEIRA, J. M. DE. Vista do Resíduos de agrotóxicos no leite humano e seus impactos na saúde materno-infantil: resultados de estudos brasileiros. **SEGURANÇA ALIMENTAR E NUTRICIONAL**, 2015. Disponível em: <<https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/san/article/view/8641594/9094>>. Acesso em: 10/11/2020.

MERIB, J.; CARASEK, E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. **Scientia Chromatographica**, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4322/sc.2014.008>>. Acesso em: 7/12/2020.

MILHOME, M. A. L.; SOUSA, D. DE O. B. DE; LIMA, F. DE A. F.; NASCIMENTO, R. F. DO. Assessment of surface and groundwater potential contamination by agricultural pesticides applied in the region of Baixo Jaguaribe, CE, Brazil. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 14, n. 3, p. 363–372, 2009. ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitaria e Ambiental. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-41522009000300010&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 10/11/2020.

MORADI, M.; YAMINI, Y.; BAHERI, T. Analysis of abuse drugs in urine using surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 14, p. 1722–1729, 2011. J Sep Sci. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21608128/>>. Acesso em: 30/11/2020.

MOREIRA, B. J.; MICHIKO, J.; YOKOYA, C.; MASETTO DE GAITANI, C. Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME): principles, innovations and biological applications. **Instituto Internacional de Cromatografia Scientia Chromatographica**, v. 6, n. 3, p. 186–204, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4322/sc.2015.005>>. Acesso em: 24/3/2021.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH - NIH. Aminocarb | C₁₁H₁₆N₂O₂ - PubChem. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aminocarb>>. Acesso em: 30/11/2020.

NETO, Á. J. DOS S. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica**, 2009. Disponível em: <www.scientiachromatographica.com>. Acesso em: 21/7/2021.

NI, Y.; XIAO, W.; KOKOT, S. Application of chemometrics methods for the simultaneous kinetic spectrophotometric determination of aminocarb and carbaryl in vegetable and water samples. **Journal of Hazardous Materials**, v. 168, n. 2–3, p. 1239–1245, 2009. Elsevier.

OMENA, E.; OENNING, A. L.; MERIB, J.; et al. A green and simple sample preparation method to determine pesticides in rice using a combination of SPME and rotating disk sorption devices. **Analytica Chimica Acta**, v. 1069, p. 57–65, 2019. Elsevier B.V.

PAVANI, N. D. **PESTICIDAS: UMA REVISÃO DOS ASPECTOS QUE ENVOLVEM ESSES COMPOSTOS**. Bauru, 2016.

PENG, G.; HE, Q.; MMEREKI, D.; et al. Dispersive solid-phase extraction followed by vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of a floating organic droplet for the determination of benzoylurea insecticides in soil and sewage sludge. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 7, p. 1258–1265, 2016. Wiley-VCH Verlag. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201501347>>. Acesso em: 30/11/2020.

PINTO, I. P. DE; PEDROSO, M. P. Microextração em gota única (SDME): fundamentos e aplicações Single drop microextraction (SDME): fundamentals and applications. **Instituto Internacional de Cromatografia Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 3, p. 183, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4322/sc.2016.003>>. Acesso em: 7/12/2020.

PRADO, A. G. S. Green chemistry, the chemical challenges of the new millenium. **Quimica Nova**, v. 26, n. 5, p. 738–744, 2003. Sociedade Brasileira de Química. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000500018&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 30/11/2020.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620–1634, 2009. Sociedade Brasileira de Química. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000600046&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 30/11/2020.

RAMA, E. M.; BORTOLAN, S.; VIEIRA, M. L.; GERARDIN, D. C. C.; MOREIRA, E. G. Reproductive and possible hormonal effects of carbendazim. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 476–486, 2014. Academic Press Inc.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; MILANI HOSSEINI, M. R.; et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1–2, p. 1–9, 2006. Elsevier.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, abr. 2010. J Chromatogr A. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20005521/>>. Acesso em: 30/11/2020.

RIBANI, M.; BEATRIZ, C.; BOTTOLI, G.; et al. **VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICOS**. 2004.

SANAGI, M. M.; ABBAS, H. H.; IBRAHIM, W. A. W.; ABOUL-ENIEN, H. Y. Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic droplet for the determination of triazine herbicides in water and sugarcane samples. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 557–562, 2012.

SANSEVERINO, A. M. Clean organic synthesis. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 102–107, 2000. Sociedade Brasileira de Química. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422000000100018&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 30/11/2020.

SARAFRAZ-YAZDI, A.; AMIRI, A. Liquid-phase microextraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, 1. jan. 2010. Elsevier.

SILVÉRIO, F. O.; SILVA, J. G. S.; AGUIAR, M. C. S.; CACIQUE, A. P.; DE PINHO, G. P. Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2052–2056, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012001000027&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 9/12/2020.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª edição ed. Editora Thomson, 2006.

SOUSA, F. V. DE; RESENDE, F. A.; WATANABE, G. A.; et al. Intoxicação por compostos organofosforados e síndrome Intermediária. **Revista Médica de Minas Gerais**, 2009. Disponível em: <<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:77iMMz9IrlwJ:rmmg.org/exportar-pdf/1209/v19n2s3a12.pdf+&cd=17&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br>>. Acesso em: 23/11/2020.

SPIETELUN, A.; MARCINKOWSKI, Ł.; DE LA GUARDIA, M.; NAMIEŚNIK, J. Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. **Talanta**, v. 119, p. 34–45, 2014. Elsevier B.V.

STOPPELLI, I. M. DE B. S.; MAGALHÃES, C. P. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, n. suppl, p. 91–100, 2005. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232005000500012&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 30/11/2020.

TANG, S.; QI, T.; ANSAH, P. D.; et al. Single-drop microextraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 108, p. 306–313, 2018. Elsevier B.V.

TANKIEWICZ, M.; BIZIUK, M. Fast, sensitive and reliable multi-residue method for routine determination of 34 pesticides from various chemical groups in water samples by using dispersive liquid–liquid microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 2017 410:5, v. 410, n. 5, p. 1533–1550, 2017. Springer. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-017-0798-4>>. Acesso em: 20/7/2021.

VICHAPONG, J.; BURAKHAM, R.; SRIJARANAI, S. Vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid-liquid microextraction with solidification of floating organic droplet combined with HPLC for the determination of neonicotinoid pesticides. **Talanta**, v. 117, p. 221–228, 2013. Elsevier B.V.

WANG, Y.; WANG, S.; LUO, C.; et al. The effects of rice canopy on the air-soil exchange of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides using paired passive air samplers. **Environmental Pollution**, v. 200, p. 35–41, 2015. Elsevier Ltd.

YANG, M.; ZHANG, P.; HU, L.; et al. Ionic liquid-assisted liquid-phase microextraction based on the solidification of floating organic droplets combined with high performance liquid chromatography for the determination of benzoylurea insecticide in fruit juice. **Journal of Chromatography A**, v. 1360, p. 47–56, 2014. Elsevier. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25124227/>>. Acesso em: 30/11/2020.

YOU, X.; WANG, S.; LIU, F.; SHI, K. Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction based on the solidification of a floating organic droplet used for the simultaneous determination of six fungicide residues in juices and red wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1300, p. 64–69, 2013. J Chromatogr A. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23473514/>>. Acesso em: 30/11/2020.

ZHOU, Q.; FANG, Z. Graphene-modified TiO₂ nanotube arrays as an adsorbent in micro-solid phase extraction for determination of carbamate pesticides in water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 869, p. 43–49, 2015. Elsevier.