



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Determinação de Carbendazim em Suco de Laranja, Empregando  
Extração na Ponteira Descartável de Micropipeta com Sorvente  
Preparado em Laboratório**

Candidato: **Carlos Augusto Santos Aguiar Júnior**

Orientador: **Prof. Dr. Anizio Márcio de Faria**

**ITUIUTABA, MG**  
**Fevereiro de 2019**

**Determinação de Carbendazim em Suco de Laranja, Empregando  
Extração na Ponteira Descartável de Micropipeta com Sorvente  
Preparado em Laboratório**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Candidato: **CARLOS AUGUSTO DOS SANTOS AGUIAR JÚNIOR**

Orientador: **Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria**

Área de concentração: **Química Analítica**

**ITUIUTABA, MG**  
**Fevereiro de 2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

A282d      Aguiar Júnior, Carlos Augusto dos Santos, 1989-  
2019      Determinação de carbendazim em suco de laranja, empregando extração na ponteira descartável de micropipeta com sorvente preparado em laboratório [recurso eletrônico] / Carlos Augusto dos Santos Aguiar Júnior. - 2019.

Orientador: Anizio Marcio de Faria.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química.  
Modo de acesso: Internet.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.364>  
Inclui bibliografia.  
Inclui ilustrações.

1. Química. 2. Suco de laranja. 3. Extração (Química). 4. Defensivos vegetais - Análise. I. Faria, Anizio Marcio de, 1977- (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

---

CDU: 54

Maria Salete de Freitas Pinheiro - CRB6/1262



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL**  
**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em**  
**Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia**  
**DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 300/PPQUI.**



**DATA:** 28/02/2019

**DISCENTE:** Carlos Augusto Santos Aguiar Júnior

**MATRÍCULA:** 11712QMI013

**TÍTULO DO TRABALHO:** Determinação de carbendazim em néctar de laranja, empregando extração na ponteira descartável de micropipeta com sorvente preparado em laboratório.

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:** Química

**LINHA DE PESQUISA:** Ciência dos Materiais: Química do Estado Sólido

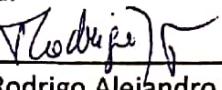
**PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO:** Cromatografia líquida de interação hidrofílica - novos materiais de separação: preparação e aplicações

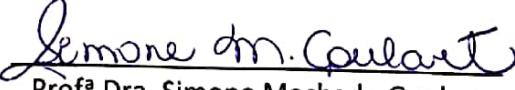
Às nove horas do dia vinte e oito de fevereiro de dois mil e dezenove, no(a) Auditório 2 do Bloco 1B no Campus do Pontal, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelo Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz, Universidade Federal de Uberlândia, Profª Dra. Simone Machado Goulart, Instituto Federal Goiano e Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas no Regulamento do Programa PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e Aprovou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho

será

DETERMINAÇÃO DE CARBENDAZIM EM SUCO DE LARANJA, EMPREGANDO EXTRACÇÃO NA PONTEIRA DESCARTÁVEL DE MICROPÍPERA COM SORVENTE PREPARADO EM LABORATÓRIO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 11 horas e 55 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

  
Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz

  
Profª Dra. Simone Machado Goulart

  
Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria

## **DEDICATÓRIA**

**Aos meus pais Carlos Augusto e  
Lazara Fernandes por  
apoarem a realização dos meus  
objetivos e ideais.**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares: Tia Nice, Raphael Augusto, Felipe Augusto, Tia Gal;

Aos meus amigos e companheiros do grupo de Cromatografia (CroMat): Allyson, Giselle, Jarbas Fontoura, Andressa, Marcelo, Ana Maria Salomão, Nadja Macedo, Augusto Novais.

Aos meus amigos do grupo de Eletroanalítica: Lauro, Diele, Ana Clara.

Aos meus amigos de inorgânica: Thiago Santos, Luana Munique, Thayne dos Santos.

Aos meus amigos de outros grupos: Thayná Oliveira, Fernanda Lopes, Fernanda Graciano, Ana Manoela.

Aos meus professores: Regina Takeuchi, André Luiz, Elaine Kikuti, Antônio Carlos (Flash), Rodrigo Panatieri, Luís Rogério Dinelli, André Luiz Bogado, Hugo de Souza, Rosana Maria.

Aos técnicos do laboratório: João Batista, Júlia Vieira, Luiz André Juvêncio.

Aos membros da banca por terem aceitado meu convite: Simone Goulart, Rodrigo Muñoz.

Ao meu orientador por ter me apoiado e ajudado por todos esses anos: Anizio Marcio de Faria.

À FINEP, pelo auxílio que possibilitou a construção dos blocos de laboratórios de Pesquisas (incluindo o Laboratório de Pesquisas em Materiais de Separação e Cromatografia) e a aquisição de equipamentos para o Laboratório de Equipamentos Multiusuários do Pontal (LEMUP) da Universidade Federal de Uberlândia (FINEP/2013 INFR13 01.13.0371.00).

E, por fim, aquela pessoa que me deu ótimos conselhos: Célia Passos.

## RESUMO

O carbendazim é fungicida benzimidazólico com alta estabilidade no ambiente e muito empregado no controle de fungos, tendo sido destaque negativo mundial no início desta década por ser encontrado em altas taxas em laranjas brasileiras. Devido às características de polaridade do carbendazim, sua extração exige procedimentos com misturas de sorventes polares e apolares, tornando o processo mais dispendioso e complexo. Neste sentido, buscou-se desenvolver neste trabalho um sorvente com seletividade ao carbendazim a partir da imobilização térmica de poli(glicidoxipropilmetil-*co*-dimetilsiloxano) (PGPMS) sobre sílica. O sorvente foi caracterizado morfológica e estruturalmente, apresentando-se como partículas irregulares mesoporosas de elevada área superficial,  $250 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , alta estabilidade térmica e revestidas com uma camada polimérica fina de PGPMS. O Si(PGPMS) foi empregado como sorvente para a extração de carbendazim em suco de laranja na ponteira descartável de micropipeta (DPX). As condições de extração do carbendazim em suco de laranja pelo método DPX com o sorvente Si(PGPMS) foram otimizadas, empregando um planejamento composto central. As análises dos extratos foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD). O método DPX CLAE-DAD para a determinação do carbendazim em suco de laranja foi validado em conformidade ao documento SANTE/11813/2017, protocolo empregado pela comunidade europeia, apresentando-se como um método de boa exatidão (recuperações entre 98-112 %), boa precisão ( $\text{RSD} < 16 \%$ ) e com limite de quantificação de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  (abaixo do limite máximo residual para o carbendazim em laranjas). O método DPX foi empregado a amostras comerciais de suco de laranja para a determinação de carbendazim, não sendo detectada a presença de resíduos do agrotóxico. As amostras foram então fortificadas com padrão de carbendazim e o método DPX foi empregado para recuperação do agrotóxico, alcançando taxas de 93 a 108 %, sem efeitos matriz, resultados que foram comparáveis a um método de referência baseado na extração QuEChERS com taxas de recuperação 77 a 99 %. De uma forma geral, pode-se concluir que o sorvente preparado no laboratório foi eficaz na extração DPX de carbendazim de suco de laranja, apresentando alta seletividade, comprovada pela extração em ciclo único no método DPX. Além disso, o método é simples e rápido, emprega volumes pequenos de amostra e solvente, pequena quantidade de sorvente para a determinação eficiente de carbendazim.

**Palavras-chave:** Carbendazim, suco de laranja, DPX, CLAE-DAD, Si(PGPMS).

## ABSTRACT

Carbendazim is a benzimidazole fungicide with high stability in the environment and very used in the fungi control, having been negative global prominence at the beginning of this decade because it was found at high rates in Brazilian oranges. Due to the carbendazim polarity, its extraction requires procedures with mixtures of polar and nonpolar sorbents, making the process more expensive, poor selective and complex. In this sense, we have developed a new sorbent selective to carbendazim based on the thermal immobilization of poly(glycidoxypropylmethyl-*co*-dimethylsiloxane) (PGPMS) onto irregular silica particles. The sorbent was characterized morphologically and structurally, presenting as mesoporous irregular particles with high surface area,  $250 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , high thermal stability and coated by a thin polymeric layer of PGPMS. Si(PGPMS) was used as sorbent for the carbendazim extraction from orange juices into the disposable micropipette tip (DPX). The extraction conditions of carbendazim from orange juices by the DPX method with the sorbent Si(PGPMS) were optimized, using a central composite design. The sample extracts were quantified by high-performance liquid chromatography and diode array detection (HPLC-DAD). The DPX HPLC-DAD method for the determination of carbendazim in orange juice was validated according to the SANTE/11813/2017 document, protocol used by the European community, presenting as a method of good accuracy (recoveries between 98-112 %), good precision ( $\text{RSD} < 16\%$ ) and limit of quantification of  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  (below the maximum residue limit for carbendazim in oranges). The DPX method was used in commercial orange juice samples for the determination of carbendazim, and the presence of pesticide residues was not detected. The samples were then fortified with carbendazim standard solution and the DPX method was used for the pesticide recovery, reaching rates of 93 to 108 %, without matrix effects, results that were comparable to a reference method based on QuEChERS extraction recovery rates 77 to 99 %. Summarizing, it can be concluded that the lab-made sorbent was effective in the DPX extraction of carbendazim in orange juice samples, presenting high selectivity, proved by the single extraction cycle in DPX method. In addition, the method is simple and fast, employing small volumes of sample and solvent, small amount of sorbent for the efficient determination of carbendazim.

**Passwords:** Carbendazim, orange juice, DPX method, HPLC-DAD, Si(PGPMS) sorbent.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BET	Método de Brunauer, Emmett e Teller
C <sub>18</sub>	Octadecilsilano ligado quimicamente à partículas de sílica
CBZ	Carbendazim
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector por Arranjo de Diodos
DDT	1,1,1-tricloro-2,2-bis( <i>p</i> -clorofenil)etano
DL <sub>50</sub>	Dosagem letal capaz de matar 50% dos animais testados em condições pré-definidas
DPX	Disposable Pippete Tip Extraction
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Food Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy
GC-MS	Gas Chromatography Mass Spectrometry
LC-MS/MS	Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry
LLME	Liquid-liquid Microextraction
LOQ	Limit of Quantification
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MIP	Molecularly Imprinted Polymer
MSPD	Matrix solid phase extraction
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PEO	Poli(óxido de etileno)
PGPMS	Poli(Glicidoxipropilmetsilosano-co-dimetilosilosano)
PSA	Primary Secundary Amines
QuEChERS	Quick, Easey, Cheap, Effective, Rugged and Sage
RSD	Relative Standard Deviation
Si(PGPMS)	Sorvente baseado na imobilização térmica de PGPMS sobre sílica
SPE	Solid Phase Extraction
TFAA	Anidrido trifluoracético
TGA	Thermogravimetric analysis
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UHPLC	Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUTURA QUÍMICA DO CARBENDAZIM.	15
FIGURA 2. ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO NA PONTEIRA DESCARTÁVEL DE MICROPIPETA (DPX).	19
FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA DO POLI(GLICIDOXIPIRMETIL-CO-DIMETILSILOXANO).	21
FIGURA 4. ILUSTRAÇÃO DA PONTEIRA DESCARTÁVEL DE POLIPROPILENO DE 1 mL PREENCHIDA COM O SORVENTE Si(PGPMS).	24
FIGURA 5. MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DA (A) SÍLICA PURA E DO (B) SORVENTE Si(PGPMS).	36
FIGURA 6. ISOTERMA DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DE N <sub>2</sub> NO SORVENTE Si(PGPMS).	38
FIGURA 7. CURVAS TG PARA O POLÍMERO (A) PGPMS E PARA (B) O SORVENTE Si(PGPMS).	39
FIGURA 8. ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (A) DA SÍLICA NUA E (B) DO SORVENTE Si(PGPMS).	40
FIGURA 9. RECUPERAÇÕES DE CARBENDAZIM DO SUCO DE LARANJA APÓS A EXTRAÇÃO DPX DELINEADA DE ACORDO COM O PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2 <sup>7-3</sup> .	41
FIGURA 10. EFEITO DAS VARIÁVEIS NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DPX DE RESÍDUOS CARBENDAZIM DE SUCO DE LARANJA, EMPREGANDO Si(PGPMS).	42
FIGURA 11. SUPERFÍCIE DE RESPOSTAS PARA A RECUPERAÇÃO DE CARBENDAZIM DE SUCO DE LARANJA EMPREGANDO EXTRAÇÃO NA PONTEIRA DESCARTÁVEL COM O SORVENTE Si(PGPMS). VARIÁVEIS SOB OTIMIZAÇÃO: MASSA DE ADSORVENTE E VOLUME DE SOLVENTE EXTRATOR.	45
FIGURA 12. SUPERFÍCIE DE RESPOSTAS PARA A RECUPERAÇÃO DE CARBENDAZIM DE SUCO DE LARANJA EMPREGANDO EXTRAÇÃO NA PONTEIRA DESCARTÁVEL COM O SORVENTE Si(PGPMS). VARIÁVEIS SOB OTIMIZAÇÃO: VOLUME DE AMOSTRA E VOLUME DE SOLVENTE EXTRATOR.	47
FIGURA 13. SUPERFÍCIE DE RESPOSTAS PARA A RECUPERAÇÃO DE CARBENDAZIM DE SUCO DE LARANJA EMPREGANDO EXTRAÇÃO NA PONTEIRA DESCARTÁVEL COM O SORVENTE Si(PGPMS). VARIÁVEIS SOB OTIMIZAÇÃO: VOLUME DE AMOSTRA E MASSA DE ADSORVENTE.	48
FIGURA 14. CROMATOGRAMAS SOBREPOSTOS PARA ANÁLISE DE UMA AMOSTRA EM BRANCO (SUBMETIDA AO PROCESSO DE EXTRAÇÃO); UMA AMOSTRA DO BRANCO FORTIFICADA COM SOLUÇÃO PADRÃO DE CARBENDAZIM NO LMR, E; DE UMA SOLUÇÃO PADRÃO DE CARBENDAZIM EM METANOL NA CONCENTRAÇÃO DO LMR. CONDIÇÕES DE ANÁLISE VIDE SEÇÃO 3.5.	50

FIGURA 15. (A) CURVAS ANALÍTICAS PARA O CARBENDAZIM PREPARADO EM SOLVENTE E NA  
MATRIZ DA AMOSTRA EXTRAÍDA PELO MÉTODO DPX OTIMIZADO. (B) CROMATOGRAMAS DOS  
PADRÕES DE CARBENDAZIM EMPREGADOS NA CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA. 53

FIGURA 16. RECUPERAÇÃO DE RESÍDUOS DE CARBENDAZIM EM AMOSTRAS DE SUCO DE LARANJA  
FORTIFICADOS NO LIMITE MÁXIMO RESIDUAL ESTABELECIDO PELA FAO, EMPREGANDO OS  
MÉTODOS DPX E QUECHERS. N = 3. 57

FIGURA 17. CROMATOGRAMAS DOS EXTRATOS DE AMOSTRAS COMERCIAIS DE SUCOS DE LARANJA,  
FORTIFICADAS COM  $1,0 \mu\text{G ML}^{-1}$  DE SOLUÇÃO PADRÃO DE CARBENDAZIM, OBTIDOS PELOS  
MÉTODOS (A) DPX COM O SORVENTE Si(PGPMS) E (B) QUECHERS. 58

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CLASSIFICAÇÃO TOXICOLÓGICA E DOSE LETAL MEDIANA DOS AGROTÓXICOS.	14
TABELA 2. VARIÁVEIS E SEUS NÍVEIS AVALIADOS NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DPX DE CARBENDAZIM DE SUCO DE LARANJA, EMPREGANDO Si(PGPMS).	27
TABELA 3. MATRIZ DE EXPERIMENTOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO $2^{7-3}$ , COM RELAÇÕES GERADORAS $I = +ABC\bar{E}$ , $I = +BCDF$ E $I = +ABCDG$ PARA O PROCESSO DE EXTRAÇÃO DPX DE CARBENDAZIM DE SUCO DE LARANJA, EMPREGANDO Si(PGPMS).	28
TABELA 4. VARIÁVEIS E SEUS NÍVEIS AVALIADOS NO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL PARA A OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DPX DE EXTRAÇÃO DE CARBENDAZIM DE SUCO DE LARANJA EMPREGANDO O SORVENTE Si(PGPMS).	30
TABELA 5. MATRIZ EXPERIMENTAL DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL PARA A OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DPX DE EXTRAÇÃO DE CARBENDAZIM DE SUCO DE LARANJA EMPREGANDO O SORVENTE Si(PGPMS).	30
TABELA 6. ÁREA SUPERFICIAL ESPECÍFICA ( $S_{BET}$ ), VOLUME ( $V_p$ ) E DIÂMETRO DE POROS ( $D_p$ ) DAS PARTÍCULAS DE SÍLICA PURA E DO SORVENTE Si(PGPMS).	37
TABELA 7. PRINCIPAIS ATRIBUIÇÕES DAS BANDAS DOS ESPECTROS VIBRACIONAIS DO Si(PGPMS) NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO.	40
TABELA 8. RECUPERAÇÃO DE RESÍDUOS DE CARBENDAZIM EM SUCO DE LARANJA, EMPREGANDO UM PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL.	44
TABELA 9. LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DPX DE RESÍDUOS DE CARBENDAZIM DE SUCO DE LARANJA COM QUANTIFICAÇÃO POR CLAE-DAD.	52
TABELA 10. PARÂMETROS ANALÍTICOS EXTRAÍDOS DA CURVA ANALÍTICA PARA O MÉTODO DPX DE RESÍDUOS DE CARBENDAZIM DE SUCO DE LARANJA COM QUANTIFICAÇÃO POR CLAE-DAD.	54
TABELA 11. EXATIDÃO E PRECISÃO DO MÉTODO DPX NA EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS DE CARBENDAZIM DE SUCO DE LARANJA COM DETECÇÃO POR CLAE-DAD.	55
TABELA 12. VANTAGENS DO MÉTODO DPX EMPREGANDO O SORVENTE Si(PGPMS) NA EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS DE CARBENDAZIM EM SUCO DE LARANJA.	58

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 CARBENDAZIM	14
1.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE CARBENDAZIM EM SUCO DE LARANJA	16
1.2.1 <i>Extração na ponteira descartável de micropipeta</i>	18
2 OBJETIVOS	22
3 METODOLOGIA	23
3.1 MATERIAIS, SOLVENTES, REAGENTES E EQUIPAMENTOS	23
3.2 PREPARAÇÃO DO SORVENTE Si(PGPMS)	23
3.2.1 <i>Preparação das ponteiras descartáveis com o sorvente Si(PGPMS)</i>	24
3.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SORVENTE Si(PGPMS)	24
3.3.1 <i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho</i>	24
3.3.2 <i>Análise termogravimétrica</i>	25
3.3.3 <i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	25
3.3.4 <i>Análise de área superficial e porosidade</i>	25
3.4 EXTRAÇÃO EM PONTEIRA DESCARTÁVEL DE CARBENDAZIM EM SUCO DE LARANJA COM Si(PGPMS)	26
3.4.1 <i>Preparação de soluções de carbendazim</i>	26
3.4.2 <i>Amostras de laranja</i>	27
3.4.3 <i>Seleção de variáveis na extração DPX de carbendazim de suco de laranja</i>	27
3.4.4 <i>Otimização do método DPX de carbendazim de suco de laranja</i>	29
3.4.5 <i>Validação do método DPX de carbendazim de suco de laranja</i>	31
3.4.5.1 <i>Linearidade</i>	31
3.4.5.2 <i>Limite de quantificação</i>	32
3.4.5.3 <i>Seletividade do método</i>	32
3.4.5.4 <i>Exatidão</i>	33
3.4.5.5 <i>Precisão</i>	33
3.4.6 <i>Aplicação do método DPX na extração de carbendazim de amostras de suco de laranja</i>	34
3.5 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DE ANÁLISE	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO Si(PGPMS)	36
4.1.1 <i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	36

4.1.2 Análise de área superficial e porosidade	37
4.1.3 Análise termogravimétrica	38
4.1.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	39
4.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DPX PARA EXTRAÇÃO DE CARBENDAZIM DE SUCO DE LARANJA	41
4.2.1 Planejamento fatorial fracionário $2^{7-3}$	41
4.2.2 Planejamento composto central	44
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DPX	50
4.3.1 Seletividade/especificidade	50
4.3.2 Limite de detecção e limite de quantificação	51
4.3.3 Linearidade e faixa de trabalho	53
4.3.4 Precisão e exatidão	54
4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO DPX A AMOSTRAS COMERCIAIS DE SUCO DE LARANJA	56
4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
5 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

## 1 INTRODUÇÃO

O carbendazim é um fungicida proveniente do grupo benzimidazóis utilizados para o tratamento de sementes, solos e folhas (COUTINHO *et.al.*, 2006). No Brasil, o carbendazim passou a ser implementando como uma alternativa para o combate de fungos principalmente na laranja já que o benomil, que era até então usado para esta finalidade, havia sido proibido pelos órgãos e agências governamentais em virtude de sua toxicidade e riscos ao meio ambiente (AGROLINK, 2019).

Desde os primórdios das civilizações, quando o homem passou a viver em sociedade e empregou a terra para produção do seu próprio alimento seja pela agricultura ou pecuária, havia inquietação sobre as pragas e as consequências que elas causavam, como a fome (OLIVEIRA; MARTINS; APPELT, 2010). Desde então, alguns povos antigos praticavam rituais religiosos como rezas e oferendas, porque entendiam que as pragas eram obras das divindades, já outros povos empregaram compostos químicos como arsênio, enxofre, mercúrio para combatê-las com mais eficácia (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

Atualmente, com o progresso da ciência e da tecnologia tem-se a informação de que as pragas podem ter tanto tamanho microscópico no caso de fungos e bactérias como macroscópicos como ratos, gafanhotos, besouros, plantas daninhas, etc. A fim de obter uma qualidade e quantidade maior de alimentos na produção e atender o grande mercado consumidor, teve-se a necessidade de reduzir o número de pragas com rapidez e alta eficiência (SANCHES *et al.*, 2003).

Com o desenvolvimento das diversas áreas tecnológicas, além da evolução das áreas química e biológicas principalmente com síntese de compostos orgânicos, conseguiu-se sintetizar esses produtos para combater pragas, os quais ficaram conhecidos como agrotóxicos (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

No Brasil, de acordo com decreto nº 4.074 de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7.802/1989, o termo agrotóxico refere-se a 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 (SILVA *et al.*, 2005).

No período da segunda guerra mundial, entre 1939-1945, muitos soldados sofreram com várias pestes, tais como malária e piolho e com isso teve-se a ideia de empregar o DDT [1,1,1-tricloro-2,2-bis(*p*-clorofenil) etano] criado pelo químico alemão Zeidler em 1864 (IVANOFF, 2011). Entretanto, só em 1939 que o químico suíço Paul Muller revelou as propriedades do DDT para combater essas pragas (MAGALHÃES, 2003). Já outros agrotóxicos como organofosforados e carbamatos foram previamente testados pelos soldados como armas químicas e, algum tempo depois, seriam empregados nas atividades do meio rural (IVANOFF, 2011).

A implementação dos agrotóxicos no Brasil ocorreu na segunda guerra para combater algumas pragas como o mosquito transmissor da malária, o *Anopheles*, contendo o Plasmodium. Após a Revolução Verde os produtores recebiam crédito rural para financiar compra de materiais desde que empregassem os agrotóxicos na produção, foi a partir deste ponto que passaram a ser utilizados em larga escala no Brasil (SILVA *et al.*, 2005). Todavia, devido ao seu uso desordenado e na maior parte sem necessidade, os resíduos dos agrotóxicos estavam contaminando o solo e as águas, além das doenças que ocasionavam aos produtores devido à toxicidade dos princípios ativos (MALINOWSKI; MALINOWSKI, 2011). Só então na década de 1980 que estudos e meios apropriados de se eliminar as pragas corretamente e, assim, classificar os agrotóxicos pelo seu grau de toxicidade. Tempos depois, foi introduzida na Constituição Brasileira a Lei 7802/1989 que regulamentou o uso dos agrotóxicos, seguindo uma série de normas e regras (ALVES FILHO, 2002) como aquelas que se referem a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos.

Dependendo para qual tipo ou espécie de praga que se deseja combater, os agrotóxicos são classificados em: inseticidas, herbicidas, fungicidas, raticidas, moluscocidas, nematicidas, acaricidas e desfolhantes (DUARTE, 2004).

Apesar das vantagens que o uso de agrotóxicos propicia, como o combate de pestes, fungos, bactérias; a aplicabilidade em uma vasta área, e; principalmente obtenção de bons resultados de combate em curto período de tempo, o seu uso indiscriminado acarreta em graves problemas de saúde e contaminação ambiental devido à sua toxicidade (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

A toxicidade ao homem e também aos seres vivos que compõem o meio ambiente varia de acordo com seu grau de exposição aos agrotóxicos. De acordo com literatura, através

de várias análises e testes, foi estabelecida uma quantidade que pode ser letal aos animais que é chamada dosagem letal (DL<sub>50</sub>), definida como dosagem que pode matar 50% dos animais testados em condições estabelecidas pelos analistas. A partir destas análises, os agrotóxicos podem ser classificados quanto ao seu grau de toxicidade referente a dosagem letal média (DL<sub>50</sub>) por via oral, representada por miligramas do ingrediente ativo do produto por quilograma do peso vivo necessário para matar 50 % da população de ratos ou de outro animal teste, sendo assim a DL<sub>50</sub> uma forma de estabelecer medida de segurança para minimizar os riscos do grupo a saúde humana conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Classificação toxicológica e dose letal mediana dos agrotóxicos.

Classe toxicológica	Toxicidade	DL <sub>50</sub> (mg/Kg) *	Faixa
I	Extremamente tóxico	≤ 5	Vermelha
II	Altamente tóxico	Entre 5 e 50	Amarela
III	Moderadamente tóxico	Entre 50 e 500	Azul
IV	Pouco tóxico	Entre 500 e 5000	Verde

\* Dose letal 50 aguda - DL 50 - por via oral e dérmica, para animais de laboratório, para os produtos técnicos e produtos formulados.

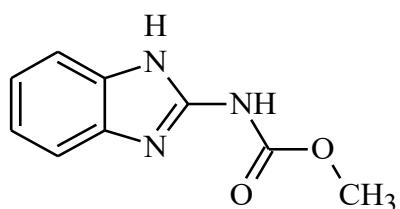
Além da toxicidade, alguns agrotóxicos possuem alta persistência ou baixa taxa de degradação, podendo permanecer no alimento e até mesmo se concentrar na matriz devido à aplicação contínua de agrotóxicos em diferentes estágios de crescimento da planta e do fruto (PEREZ; MOREIRA, 2003; MAPA, 2018).

## 1.1 Carbendazim

O metil-2-benzimidazol-carbamato, mais conhecido como carbendazim (CBZ), fórmula molecular C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O e estrutura química apresentada na Figura 1, é um subproduto originado do benomil [(Metil-1-(butilcarbamoil)-2-benzimidazolcarbamato)] e é utilizado para controlar doenças provocadas por fungos presentes nas culturas de citros como laranja, limão, maçã, tangerina e também em outras culturas como algodão, tabaco, relva e plantas ornamentais (CURTI, 2014). O tempo de meia vida do carbendazim no meio ambiente pode variar entre 2 (dois) meses, em condições aeróbias, e 25 (vinte e cinco) meses em condições anaeróbias. A solubilidade do carbendazim está relacionada com o pH do meio e a temperatura do meio onde está presente, porém vale ressaltar que na água o carbendazim apresenta uma baixa solubilidade e em temperaturas mais elevadas tem uma tendência de

ser mais solúvel, fazendo com que haja a possibilidade de ser encontrado no meio ambiente após o seu uso principalmente em alimentos que possuem a faixa de pH semelhantes ao da água (SILVA; BARROS; PAVÃO, 2014). A estabilidade química do carbendazim é considerada elevada e a degradação no ambiente é relativamente lenta, isto se dá porque os resíduos de carbendazim e seus metabólitos são fortemente ligados ou incorporados à matéria orgânica do solo pelo anel imidazol, tornando-o assim persistente no ambiente por períodos superiores a 3 anos (COUTINHO *et al.*, 2006) e sendo, portanto, encontrado no ambiente (LEE *et al.*, 2003).

Figura 1. Estrutura química do Carbendazim.



A toxicologia do carbendazim é de classe III (faixa azul), moderadamente tóxico, contudo, a *Food and Drug Administration* (FDA) afirmou que o carbendazim ocasiona um aumento de tumores no fígado e risco de gerar câncer em pessoas (MACHADO, 2007). Em relação aos animais é considerado moderadamente tóxico para as abelhas e organismos aquáticos, porém apresenta toxicidade elevada para minhocas. Em virtude aos problemas que podem incidir na saúde humana e em animais, países como os EUA e alguns membros da Comunidade Europeia proibiram a aplicação do carbendazim em seus territórios (COSTA, 2017; SILVA; BARROS; PAVÃO, 2014).

O carbendazim é um produto legalizado no Brasil, comercialmente conhecido como: Bendazol, Derosol 500 SC, Novazin, Cropchem 500 SC, Carbendazim Nortox (EMBRAPA, 2005), entre outros. É utilizado no combate de pragas como a *Guignardia citricarpa* (pinta preta) e *Colletotrichum acutatum* (estrelinha), que são fungos comuns em lavouras de laranjas. Em virtude da alta incidência desses fungos nas culturas de citros no Brasil e a eficácia do carbendazim no controle, o uso do carbendazim se estendia desde os pequenos agricultores até a produção para exportação.

O Brasil é o maior produtor de laranja do mundo, exportando na última safra mais de 1 milhão de toneladas de suco de laranja. Os Estados Unidos da América (EUA) são o maior comprador do suco de laranja brasileiro, recebendo mais de 30% do exportado na safra 2017/2018 (CITRUSBR, 2018). Devido aos aumentos registrados nas exportações de suco

de laranja nos últimos anos, o Brasil teve um bloqueio nas exportações de suco de laranja em 2012 para os EUA, em virtude do teor de resíduos de carbendazim encontrado nos sucos de laranja brasileiro (SILVA; BARROS; PAVÃO, 2014; DORFMAN; FRANÇA; DURAN, 2013). Apesar do embargo ao suco de laranja brasileiro, a detecção de resíduos de carbendazim em diversos alimentos no território brasileiro foi registrada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e publicada no relatório anual do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (ANVISA, 2016). Este fato mostra que mesmo com redução da aplicação do carbendazim nas culturas principalmente na laranja, o tempo de permanência dos resíduos pode ser suficientemente longo, ocasionando uma contaminação prolongada. Além disso, a conversão do tiofanato metílico (comercialmente vendido como Cercobin 500 SC, Cercobin 700 SC, Celeiro, Impact duo) ao carbendazim pode também ter levado ao aumento no número de registros na formação de resíduos de carbendazim nos alimentos no período. Porém, vale ressaltar que de acordo o site do Ibama (IBAMA, 2019) o carbendazim ainda estava sendo um dos produtos mais comercializado nos anos de 2015 e 2016, só depois das retificações deixou a lista das substâncias mais comercializadas e, em 2018, a página eletrônica do Senado brasileiro divulgou a notícia de que estudos revelaram que em 5 % das amostras de abacaxi comercializadas no país, havia potencial de risco de se encontrar carbendazim.

O limite máximo residual de carbendazim em citros, exceto limão, é de 1 mg/kg (FAO, 2018). Na lista do Codex Alimentarius (FAO, 2018) não há citação ou relato do limite máximo residual de carbendazim em limão, contudo no site lista outros alimentos e a quantidade de carbendazim permitida, como frutas do pomáceo que é de 3 mg kg<sup>-1</sup> ou grãos de café é de 0,1 mg kg<sup>-1</sup>.

## 1.2 Métodos de extração de carbendazim em suco de laranja

Os métodos analíticos que são empregados para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos requerem uma etapa inicial de preparação da amostra, uma vez que o alimento não pode ser introduzido diretamente no equipamento em função dos componentes de suas matrizes, potencialmente interferentes nos sinais dos agrotóxicos. Nesta etapa de preparação de amostra o objetivo principal é, portanto, o isolamento do analito dos demais constituintes do alimento a ser analisado. As etapas de um método de preparação de amostra podem requerer ainda a purificação prévia da amostra e a concentração dos analitos para uma determinação analítica sensível. Para a determinação de carbendazim em diferentes amostras

de alimentos, diversos métodos de preparação de amostra já foram estudados, tais como: microextração líquido-líquido (LLME, *liquid-liquid microextraction*), dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, *matrix solid phase extraction*), QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), extração em fase sólida (SPE, *solid phase extraction*), sorventes poliméricos de impressão molecular (MIP, *molecularly imprinted polymer*), etc. (RADISIC *et al.*, 2009; XIONGFENG; QUN; ROHRER, 2013; LIU *et al.*, 2009; BEDENDO; JARDIM; CARSEK, 2012; ILKTAÇ; AKSUNER; HENDEN, 2017; RAZZINO *et al.*, 2015).

O método mais empregado para a extração do carbendazim em amostras de suco de laranja registrado na literatura é a extração em fase sólida (SPE). Xiongfeng *et al.* (2013) empregaram a SPE *online* com uma fase sólida polar para a extração do carbendazim em suco de laranja. Os autores realizaram as medidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por arranjo de diodos (DAD), obtendo um limite de detecção para o método de  $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ . Liu *et al.* (2009) empregaram a extração em fase sólida em modo misto, mistura de sorvente de fase reversa com trocador de cátions, para a determinação simultânea de alguns fungicidas em suco de laranja, entre esses o carbendazim. A análise dos extratos foi realizada por CLAE com detecção DAD em 288 nm, obtendo taxas de recuperação para o carbendazim na faixa de 87 a 94% e limite de detecção de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Os extratos foram analisados também por cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas em série (LC-MS/MS, *liquid chromatography tandem mass spectrometry*) obtendo faixas de recuperação similares, porém limites de detecção até dez vezes mais baixos. Gilbert-López *et al.* (2007) empregaram um cartucho de extração em fase sólida com sorvente balanceado, lipofílico-hidrofílico, para a remoção de resíduos de diferentes fungicidas, dentre eles o carbendazim, de sucos de frutas. As recuperações do carbendazim ficaram entre 78 e 97% com desvios padrão relativos em torno de 13%. As análises dos extratos foram realizadas por LC-MS.

Outros dois métodos de preparação de amostra empregados para a extração de carbendazim de sucos de laranja são o MSPD e o QuEChERS. Na MSPD o sorvente é misturado à amostra e homogeneizados com auxílio de grau e pistilo. O adsorvente tem a função de romper a estrutura da matriz da amostra liberando o analito e adsorvendo-o. Posteriormente, a mistura é colocada dentro de um cartucho SPE e um solvente de eluição adequado é empregado para transferência do analito para um meio compatível com o método de análise. Solventes ou sorventes de limpeza podem ser incluídos no processo para a obtenção de um extrato límpido e livre de interferentes. Grujic *et al.* (2005) e Radisic *et al.*

(2009) extraíram o carbendazim e outros fungicidas de sucos de laranja empregando a MSPD e como sorvente de extração a terra diatomácea, esqueleto ósseo de algas marinhas. A recuperação alcançada para o carbendazim ficou na faixa de 80 e 113%, sendo os extratos analisados por LC-MS/MS. O método QuEChERS, foi desenvolvido por Anastassiades *et al.* (2003) especificamente para a extração de resíduos de agrotóxicos de amostras de frutas e vegetais. O método baseia-se na utilização da acetonitrila como solvente extrator, seguida de uma etapa de partição obtida pela adição de sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio. A limpeza do extrato é uma etapa embutida na metodologia que emprega o processo de extração em fase sólida dispersiva, com adição de sais como o próprio sulfato de magnésio anidro e o PSA (*primary secundary amines*). O sorvente PSA auxilia no processo de troca aniónica, com a habilidade em remover ácidos graxos, açucares, alguns pigmentos e outros coextrativos da matriz que formam ligações de hidrogênio. Para realizar a análise de resíduos de contaminantes na presença de matrizes contendo substâncias apolares, normalmente substitui o PSA ou adiciona conjuntamente o sorvente C<sub>18</sub> na remoção de interferentes com estas características. Rizzetti *et al.* (2016) empregaram o método QuEChERS para extrair o carbendazim e outros 73 resíduos de agrotóxicos em suco de laranja e analisá-los por cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC, *ultrahigh-performance liquid chromatography*) acoplada a espectrometria de massas em série. Os autores obtiveram recuperações para o carbendazim na faixa de 77 a 99% empregando como sorvente de limpeza no método QuEChERS o PSA e o acetato de sódio no processo de partição.

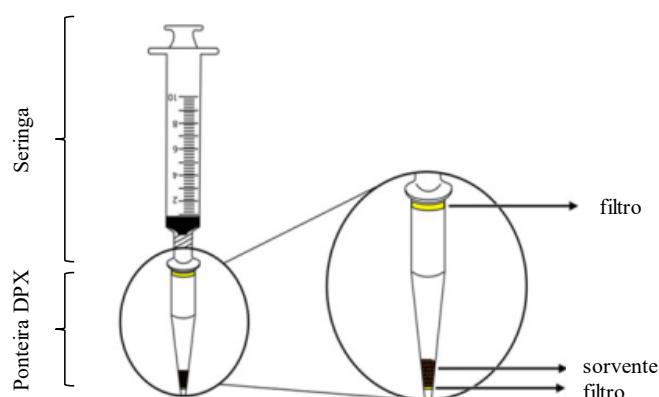
Embora esses métodos de preparação de amostra tenham demonstrado eficiência na extração de carbendazim de suco de laranja, normalmente empregam sorvente, em alguns casos mistura de sorventes, caros, de pouca seletividade e de difícil acesso. Um método que tem recebido destaque na preparação de amostra mais recentemente é a extração na ponteira descartável de micropipeta (DPX, *disposable pipette tip extraction*). A DPX pode ser considerada uma miniaturização da SPE, apresentando as vantagens que a redução das dimensões de um método normalmente gera.

### **1.2.1 Extração na ponteira descartável de micropipeta**

A DPX foi proposta por Brewer (2003) com o intuito de simplificar o processo de extração em fase sólida reduzindo o tempo e a quantidade de solventes normalmente empregados na SPE. O aparato básico da DPX é constituído de uma ponteira descartável de polipropileno empregada em micropipetas com a capacidade que varia desde 10 µL até 5

mL, preenchida parcial ou totalmente com sorventes de SPE. O sorvente normalmente é disposto livremente na ponteira na forma de pó finamente dividido entre dois filtros o que permite a passagem bidirecional de fluxo de solvente (Figura 2). O princípio da extração por DPX é o mesmo da SPE, ou seja, baseada na retenção do(s) composto(s) de interesse no sorvente a partir da afinidade entre eles.

Figura 2. Ilustração esquemática do processo de extração na ponteira descartável de micropipeta (DPX).



Fonte: Adaptado de (BORDIN *et al.*, 2016).

Analitos e interferentes contidos em uma matriz são extraídos após passar através do sorvente na ponteira da micropipeta. Inicialmente, a fase sólida é condicionada pela passagem de um solvente apropriado ou uma combinação de solventes para ativação de seus sítios de interação. A ativação dos sítios do sorvente permite a interação molecular apropriada entre a fase sólida e o analito na amostra. Um solvente orgânico ou uma mistura de solventes é usado então para remover potenciais interferentes. Após esta etapa, um solvente com afinidade pelo analito é empregado para eluí-lo da fase sólida e o extrato ser submetido a uma técnica adequada de análise.

A DPX tem se destacado em virtude da simplicidade e rapidez na preparação da amostra, bem como do uso reduzido de volume de amostra e solventes. Além disso, a DPX requer menor manipulação da amostra pelo analista, fornecendo elevadas eficiências de recuperação dos compostos. Uma vantagem adicional é a possibilidade de automação de todo processo de extração DPX na injeção do sistema cromatográfico (BORDIN *et al.*, 2016).

A DPX tem sido empregada para a extração de resíduos de agrotóxicos em alimentos e se mostrado uma alternativa mais econômica e mais versátil (GUAN *et al.*, 2010 a;

SHARIF *et al.*, 2006; LEHOTAY *et al.*, 2013; PODHORNIAK, 2014; LI *et al.*, 2012). Fernandes *et al.* (2014) empregaram a DPX como uma etapa de limpeza no método QuEChERS para a extração de 36 resíduos de agrotóxicos em morango. Como sorventes os autores empregaram uma mistura 1:1 de PSA e C<sub>18</sub> (octadecilsilano) obtendo recuperações na faixa de 78-130% para os agrotóxicos, resultados comparáveis com o método original QuEChERS empregando sorventes no modo de extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, *dispersive solid phase extraction*). Guan *et al.* (2010 b) empregaram a DPX para a extração de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais com análise por cromatografia gasosa com detecção espectrométrica de massas (GC-MS, *gas chromatography-mass spectrometry*). Os autores empregaram como sorvente DPX estireno divinilbenzeno para extração dos agrotóxicos em amostras de cenoura e laranja alcançando percentuais de recuperação na faixa de 21-116%, apresentando maiores dificuldades para extração de compostos polares devido ao uso de um sorvente apolar.

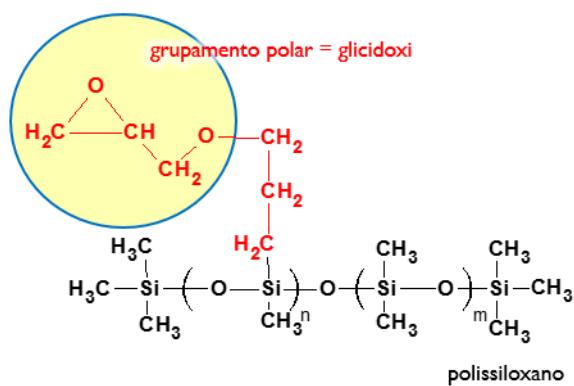
Como os sorventes comercialmente disponíveis muitas vezes não possuem capacidade adequada de adsorção, é comum que na DPX se utilize de vários ciclos de aspiração e dispensa do eluato para extrair os analitos eficientemente no sorvente (SPRINGER *et al.*, 2014). Por conseguinte, se for utilizado um sorvente adequado com elevada capacidade de adsorção, a operação de repetição, que causa lentidão e perda de repetibilidade do método, pode ser evitada. Desta forma, neste trabalho propõe-se a preparação de um novo sorvente, com características de polaridade moderada, para extração DPX do carbendazim de suco de laranja.

Com o objetivo de produzir um material de baixo custo e com seletividade para compostos polares, assim como o carbendazim ( $\log P$  1,46), buscou-se produzir uma fase sólida a partir do método de evaporação estática do solvente (FARIA, COLLINS; JARDIM, 2009) através da imobilização física de um polímero orgânico pré-sintetizado sobre partículas de um sólido inorgânico. Neste método, além da simplicidade e de não envolver nenhum reagente químico, o polímero é depositado como uma fina camada sobre as partículas do óxido inorgânico, resultando em um encapsulamento das partículas. Este recobrimento é mais completo da superfície do óxido que o fornecido pela reação química de organossilanos normalmente empregada para a preparação de fases sólidas convencionais. Além disso, a seletividade da fase sólida é dependente dos grupos funcionais presentes no polímero empregado para a imobilização. A fixação do polímero sobre a superfície do óxido é garantida por um procedimento de imobilização física, tais como

tratamento térmico (SILVA; COLLINS, 2012), irradiação micro-ondas (CARVALHO *et al.*, 2016) ou radiação gama (LOPES; COLLINS; JARDIM, 2003).

Para a preparação de um material capaz de reter o carbendazim, foi estudado o poli(glicidoxipropilmetil-co-dimetilsiloxano) (PGPMS), Figura 3, que apresenta em sua estrutura monomérica um grupo glicidóxi da qual se espera proporcionar ao sorvente uma seletividade adequada para reter o carbendazim. Substâncias polares apresentam dificuldade de retenção nos sorventes SPE convencionais, uma vez que estes se apresentam como grupamentos fortemente hidrofóbicos, oferecendo pouca retenção para tais substâncias, ou então fortemente hidrofílicos, retendo-os irreversivelmente (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010). O grupo glicidóxi do PGPMS é capaz de formar unidades de glicol por abertura hidrolítica do anel epóxi, formando cadeias de diferentes comprimentos de óxido de polietileno (PEO) por polimerização. Os grupos epoxi reagem para formar cadeias de PEO a partir da foto-polimerização, pela indução de calor ou através de catalisadores básicos ou ácidos. Além disso, o anel epóxi do PGPMS pode sofrer abertura, a qual pode permitir a formação de um poli(óxido de etileno) em condições apropriadas de eluição. A estrutura desse anel epóxi é formada por um átomo de oxigênio unido a dois átomos de carbono, que por sua vez estão unidos por uma ligação covalente (INNOCENZI *et al.*, 2009).

Figura 3. Estrutura química do poli(glicidoxipropilmetil-co-dimetilsiloxano).



Fonte: Próprio autor.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o método de extração DPX empregando um sorvente preparado em laboratório para aplicação na determinação de carbendazim em suco de laranja. Para isso, alguns objetivos específicos foram delineados:

- ✓ Preparar o sorvente Si(PGPMS) a partir da imobilização térmica do poli(glicidoxipropilmetil-co-dimetilsiloxano) sobre partículas de sílica;
- ✓ Caracterizar fisico-quimicamente o novo sorvente preparado;
- ✓ Empregar o sorvente na ponteira descartável de uma micropipeta para extração de carbendazim de suco de laranja;
- ✓ Otimizar e validar o método DPX de extração do carbendazim do suco de laranja;
- ✓ Aplicar o método validado em amostras comerciais de sucos de laranja.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Materiais, solventes, reagentes e equipamentos

Para a preparação do sorvente Si(PGPMS), do sistema de extração na ponteira descartável de micropipeta, os seguintes solventes, reagentes e materiais foram utilizados:

- Sílica gel 60 de alta pureza para coluna cromatográfica, 200-400 mesh (40-75  $\mu\text{m}$  de diâmetro de partícula), 0,75  $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$  de volume de poros, área superficial de 500  $\text{m}^2$ , Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil).
- Poli(glicidoxipropilmetil-co-dimetilsiloxano) da marca UnitedChem (Bristol, PA, EUA). Massa molecular ponderal média 5.850  $\text{g mol}^{-1}$ , massa molecular numérica média de 2.686  $\text{g mol}^{-1}$  e índice de polidispersividade de 2,178 (GAMA, 2017).
- Água ultrapura obtida de um ultrapurificador Megapurity, modelo Mega ROUP (Billerica, MA, EUA), com resistividade de 18,3  $\text{M}\Omega \text{ cm}$ .
- Álcool metílico, grau HPLC/espectroscópico, marca JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA).
- Hexano, marca Qhemis (Diadema, Brasil).
- Metil 2-benzimidazol carbamato (carbendazim), 99%, Ouro Fino (Uberaba, Brasil).
- Ácido nítrico PA, 65%, Carlo Erba (Milão, Itália).
- Cromatógrafo a líquido modelo Alliance 2695 da Waters (MA, EUA) com sistema de distribuição quaternário de solvente e detector fotométrico (PDA, *photo diode array*). A aquisição de dados foi realizada pelo software Empower3®.

#### 3.2 Preparação do sorvente Si(PGPMS)

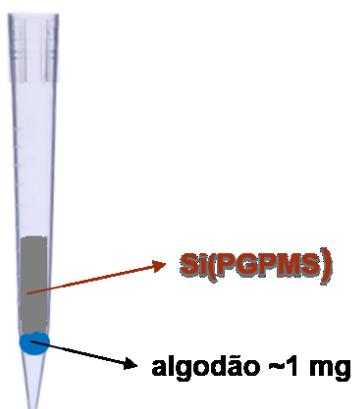
Incialmente, foi realizada a ativação de 5,0 g de sílica em estufa a 140°C por 12h. Após este período, foram adicionados 1,5 g de PGPMS e 50 mL de hexano ao frasco contendo a sílica previamente ativada. A mistura foi agitada brandamente por 2 h e 30 min em agitador magnético. Em seguida, a agitação foi desligada e a mistura foi deixada em repouso para evaporação do solvente por 4 dias em capela ao abrigo de contato com partículas do ar. Após a evaporação total do solvente, o material seco foi submetido a uma etapa de imobilização térmica para fixação do PGPMS na superfície e poros das partículas de sílica. A imobilização térmica foi realizada de acordo com o procedimento otimizado por Gama (2017), empregando temperatura de imobilização de 90 °C por 12 h. Após a etapa de

imobilização o sorvente Si(PGPMS) foi armazenado até o momento do uso na ponteira descartável de micropipeta.

### 3.2.1 Preparação das ponteiras descartáveis com o sorvente Si(PGPMS)

Ponteiras de polipropileno de 1 mL foram devidamente lavadas com água deionizada e secas ao ar antes do uso. Em seguida, um pequeno pedaço de algodão, ~1 mg, foi colocado na extremidade inferior da ponteira, bloqueando-a para impedir a passagem de partículas do sorvente. Porções apropriadas de Si(PGPMS), 60 a 240 mg, foram colocadas a seco dentro da ponteira, acondicionando-as com auxílio de um bastão de vidro. A maior porção do sorvente acondicionado dentro da ponteira não ultrapassou 50% de sua capacidade. Uma ilustração da ponteira preenchida com o Si(PGPMS) é apresentada na Figura 4.

Figura 4. Ilustração da ponteira descartável de polipropileno de 1 mL preenchida com o sorvente Si(PGPMS).



Fonte: Próprio autor.

## 3.3 Caracterização físico-química do sorvente Si(PGPMS)

### 3.3.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Pequenas porções do sorvente Si(PGPMS) foram separadas e submetidas a diferentes técnicas espectroscópicas e microscópicas para caracterização estrutural e morfológica. Para a determinação de grupos funcionais que caracterizam a presença do PGPMS no sorvente, o material foi submetido à análise por espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, *Fourier-transform infrared spectroscopy*). Uma porção

de aproximadamente 10 mg do Si(PGPMS) foi empregada para a preparação de uma pastilha de KBr, na proporção de 1:100 (m/m). Os espectros FTIR foram obtidos em uma faixa espectral de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e velocidade de varredura de 32 scans  $\text{min}^{-1}$  em um espectrofômetro de infravermelho modelo FTIR Cary 630 da Agilent (Danbury, CT, EUA) no Laboratório de Equipamentos Multiusuários do Pontal da UFU.

### ***3.3.2 Análise termogravimétrica***

Porções de aproximadamente 5 mg do sorvente Si(PGPMS) foram submetidas à análise termogravimétrica para avaliação da estabilidade e do perfil de degradação térmica. As amostras foram devidamente colocadas em porta-amostras e submetidas a um aquecimento em atmosfera inerte da temperatura ambiente ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ) até  $600^\circ\text{C}$ , a uma taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ . As medidas foram realizadas em um Analisador termogravimétrico modelo TGA 55 da TA Instruments (New Castle, DE, EUA) no Laboratório de Equipamentos Multiusuários do Pontal da UFU.

### ***3.3.3 Microscopia eletrônica de varredura***

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para a caracterização morfológica do sorvente Si(PGPMS). As partículas foram fixadas, através da pulverização do pó, em porta-amostras por uma fita dupla face de carbono. Em seguida, foram recobertas com uma fina camada de ouro, na qual o metal foi bombardeado com átomos de argônio sob alto vácuo por 120 s, para a formação de uma camada de aproximadamente 10 nm de espessura. Esses suportes foram introduzidos em um microscópio eletrônico de varredura JEOL JMS 6360-LV com microssonda de raios-X. As partículas de Si(PGPMS) foram amplificadas entre 500 e 10000 vezes, a fim de observar as suas características morfológicas. Essas medidas foram realizadas no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da UFU.

### ***3.3.4 Análise de área superficial e porosidade***

Aproximadamente 200 mg de amostras de sílica nua e do sorvente Si(PGPMS) foram submetidos à determinação de propriedades morfológicas como área superficial específica, volume total de poros e diâmetro médio de poros em um Analisador de área superficial e

porosidade ASAP modelo 2020 Plus da Micromeritics (Atlanta, GA, EUA). As amostras foram inicialmente tratadas através do aquecimento sob vácuo no próprio equipamento, iniciando a 90 °C por 60 min à pressão de 20 mm de Hg e, posteriormente, a 150 °C por 4 h (10 µm de Hg). Em seguida, as amostras foram deixadas sob vácuo até alcançarem a temperatura ambiente e submetidas a análise no equipamento. Estas medidas foram obtidas pela adsorção e dessorção de nitrogênio a -195,5 °C. A área superficial específica foi calculada de acordo com o método BET (GREGG; SING, 1982) a pressões relativas ( $p/p_0$ ) entre 0,05 e 0,30, na qual  $p$  e  $p_0$  são, respectivamente, pressões de equilíbrio e pressão de saturação do nitrogênio a -195,5 °C. O volume total de poros foi determinado pelo método do ponto único através da conversão do volume de nitrogênio dessorvido em  $p/p_0 = 0,950$  para o volume do adsorbato líquido. O diâmetro médio dos poros foi calculado a partir dos valores de volume total de poros e da área superficial BET ( $4 V_p/S_{BET}$ ). As medidas foram realizadas no Laboratório de Equipamentos Multiusuários do Pontal da UFU.

### **3.4 Extração em ponteira descartável de carbendazim em suco de laranja com Si(PGPMS)**

Para o desenvolvimento do método DPX de extração de carbendazim de suco de laranja empregando o sorvente Si(PGPMS) foi realizado um planejamento experimental divido em quatro etapas principais:

- I – Seleção das variáveis que afetam mais significativamente o método DPX através de um planejamento fatorial fracionário  $2^{7-3}$ ;
- II – Otimização do método DPX através de um planejamento composto central  $2^3$  e metodologia de superfície de resposta;
- III – Validação do método DPX empregando o protocolo da Comunidade Europeia estabelecido no documento SANTE/11813/2017 (SANTE, 2017);
- IV – Determinação de carbendazim em amostras de suco de laranja empregando o método DPX otimizado e validado com o sorvente Si(PGPMS).

#### ***3.4.1 Preparação de soluções de carbendazim***

A partir da pesagem de 10,0 mg do padrão sólido de carbendazim, foi preparada uma solução estoque a 1.000,0 µg mL<sup>-1</sup> em metanol acidificado com 10 µL de ácido nítrico concentrado. A acidificação foi necessária para a solubilização completa do carbendazim no

solvente. A solução estoque foi armazenada no freezer a -4 °C e retirada sempre que necessária a preparação de soluções de trabalho de carbendazim.

As soluções de trabalho de carbendazim foram preparadas pela diluição da solução estoque. As soluções de trabalho foram preparadas nas concentrações de 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em metanol e diluídas para concentrações menores de acordo com o requisitado no processo de otimização e validação do método.

### **3.4.2 Amostras de laranja**

As amostras de laranja foram compradas no mercado local de Ituiutaba/MG e processadas para a extração do suco em quantidades suficientes para uma semana de trabalho. As amostras estavam isentas do carbendazim, de acordo com banco de dados obtido pelo método. As laranjas e o suco de laranja foram armazenados em geladeira, mantendo-se na faixa de temperatura de 4 °C até 15 °C.

### **3.4.3 Seleção de variáveis na extração DPX de carbendazim de suco de laranja**

Para a seleção de variáveis que afetam significativamente o método DPX para extração do carbendazim de sucos de laranja empregando o sorvente Si(PGPMS) foi delineado um planejamento fatorial fracionário. Foram avaliadas 7 (sete) variáveis em 2 (dois) níveis cada, conforme indicado na Tabela 2.

*Tabela 2. Variáveis e seus níveis avaliados no processo de extração DPX de carbendazim de suco de laranja, empregando Si(PGPMS).*

Variáveis	Níveis	
	(-)	(+)
A Solvente de eluição	Metanol acidificado	Acetato de etila
B Volume de solvente (mL)	0,5	1,0
C Massa de Si(PGPMS) (mg)	50	100
D Número de ciclos de eluição	1	3
E Volume de amostra (mL)	1	2
F pH da amostra (0,005 mol L <sup>-1</sup> )	4,80	7,20
G Adição de eletrólito (KCl) (mg)	0	50

As variáveis e seus níveis foram escolhidos com base em condições experimentais de extração indicados na literatura (OENNING; MERIB; CARASEK, 2018) (GUAN *et al.*, 2010 b) (LEHOTAY *et al.*, 2013) (FERNANDES *et al.* 2014). Os ajustes de pH das amostras foram definidos nos níveis estudados devido à condição de neutralidade química da molécula de carbendazim, possibilitando interações apenas hidrofílicas e hidrofóbicas com o sorvente de extração. A escolha dos solventes foi realizada a partir de um teste preliminar, em que foram avaliados o metanol, o metanol acidificado, o acetato de etila, a acetona, a acetonitrila e o álcool etílico na eluição do resíduo de carbendazim retido no sorvente. Neste teste, as maiores recuperações foram obtidas com o metanol e o acetato de etila acidificados. Desta forma, foram definidas as variáveis e os seus níveis, combinando-os um a um, de acordo com a matriz experimental apresentada na Tabela 3, através de um planejamento fatorial fracionário  $2^{7-3}$  com três relações geradoras, em 16 (dezesseis) experimentos.

*Tabela 3. Matriz de experimentos do planejamento fatorial fracionário  $2^{7-3}$ , com relações geradoras  $I = +ABCE$ ,  $I = +BCDF$  e  $I = +ABCDG$  para o processo de extração DPX de carbendazim de suco de laranja, empregando Si(PGPMS).*

Exp.	A	B	C	D	E	F	G
1	-	-	-	-	-	-	+
2	+	-	-	-	+	-	-
3	-	+	-	-	+	+	-
4	+	+	-	-	-	+	+
5	-	-	+	-	+	+	-
6	+	-	+	-	-	+	+
7	-	+	+	-	-	-	+
8	+	+	+	-	+	-	-
9	-	-	-	+	-	+	-
10	+	-	-	+	+	+	+
11	-	+	-	+	+	-	+
12	+	+	-	+	-	-	-
13	-	-	+	+	+	-	+
14	+	-	+	+	-	-	-
15	-	+	+	+	-	+	-
16	+	+	+	+	+	+	+

Inicialmente, foram preparadas duas soluções estoque de suco de laranja, tamponando-as em pH 4,80, através da adição de 0,048 g de acetato de sódio, e em pH 7,20 através da adição de 0,068 g de fosfato de potássio monobásico. Os sucos de laranja

tamponado nos dois diferentes pH foram fortificados com a solução de carbendazim a fim de obter uma concentração final de  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Destas amostras fortificadas foram retirados 1,0 mL ou 2,0 mL das e submetidos ao processo de extração DPX.

No processo DPX, foram eluídos 1,0 mL de água e 1,0 mL de metanol pela ponteira descartável contendo 50 ou 100 mg de Si(PGPMS) para ativação dos sítios do sorvente. Em seguida, as amostras foram eluídas pela ponteira empregando um manifold a vácuo (ResPrep 12-Port SPE manifold, Restek, Bellefonte, PA, EUA) para a realização simultânea de um conjunto de extrações. (OBS: *É importante mencionar que esta operação foi também realizada com a micropipeta para aspiração da amostra e eluição dos solventes com a mesma eficácia que o manifold a vácuo. No entanto, optou-se pelo manifold apenas para a realização de um maior número de extrações simultaneamente*). Após a eluição das amostras, o manifold permaneceu sob vácuo por mais dez minutos a fim de remover todo líquido proveniente da amostra. Os resíduos de carbendazim retidos no sorvente da ponteira descartável foram eluídos com volumes de 0,5 ou 1,0 mL de metanol ou acetato de etila acidificados com 10 microlitros de ácido nítrico, obtendo-se assim os extratos que foram posteriormente analisados no cromatógrafo a líquido. No processo DPX para extração do carbendazim do suco de laranja foram avaliados ainda o efeito da adição de eletrólito (50 mg de cloreto de potássio) e o número de ciclos de extração para maior recuperação dos resíduos de carbendazim.

#### **3.4.4 Otimização do método DPX de carbendazim de suco de laranja**

Após a seleção das variáveis que mais afetaram o processo DPX de extração de carbendazim de suco de laranja empregando o sorvente Si(PGPMS), obtida pelo planejamento fatorial fracionário, o método foi otimizado a partir do delineamento de um planejamento composto central (planejamento fatorial  $2^3$  + ponto central + planejamento axial). Para a execução deste planejamento, as variáveis e os seus níveis (Tabela 4) foram combinados um a um, obtendo um total de 17 experimentos, com triplicata no ponto central, conforme pode ser observado na matriz de experimentos da Tabela 5.

*Tabela 4. Variáveis e seus níveis avaliados no planejamento composto central para a otimização do método DPX de extração de carbendazim de suco de laranja empregando o sorvente Si(PGPMS).*

Variáveis	Níveis				
	-1,73	-1,0	0	+1,0	+1,73
B Volume de solvente (mL)	0,6	1,0	1,5	2,0	2,4
C Massa de Si(PGPMS) (mg)	60	100	150	200	240
E Volume de amostra (mL)	0,6	1,0	1,5	2,0	2,4

*Tabela 5. Matriz experimental do planejamento composto central para a otimização do método DPX de extração de carbendazim de suco de laranja empregando o sorvente Si(PGPMS).*

Experimentos	B	C	E
17	-	-	-
18	+	-	-
19	-	+	-
20	+	+	-
21	-	-	+
22	+	-	+
23	-	+	+
24	+	+	+
25	0	0	0
26	0	0	0
27	0	0	0
28	-1,73	0	0
29	+1,73	0	0
30	0	-1,73	0
31	0	+1,73	0
32	0	0	-1,73
33	0	0	+1,73

A extração DPX do carbendazim de suco de laranja foi realizada a partir do condicionamento do sorvente na ponteira descartável com 1 mL de água ultrapura e 1 mL de metanol. Em seguida, volumes (0,6 a 2,4 mL) de suco de laranja (sem ajuste de pH com adição de 50 mg de KCl) fortificados com 5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de carbendazim foram eluídos pelas ponteiras contendo diferentes massas (60 a 240 mg) de Si(PGPMS), mantendo as ponteiras sob vácuo por mais 10 min (após a passagem da amostra) para remoção total de líquido do

sorvente. Volumes apropriados (0,6 a 2,4 mL) de metanol acidificado foram eluídos pelas ponteiras, recolhendo o extrato em frascos de vidro de 2,5 mL.

Em cada experimento foram obtidos os extratos da amostra, que foram analisados no cromatógrafo a líquido com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD), retirando as áreas de pico para o carbendazim após a integração dos picos no cromatogramas. A recuperação do carbendazim foi determinada a partir da equação de reta da curva analítica, levando em consideração os volumes de amostra e do eluente empregado no método DPX, de acordo com a Equação 1.

$$R = \frac{C_{ext}V_{ext}}{C_0V_0} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

$C_0$  = concentração de carbendazim inicial;  $V_0$  = volume de amostra;  $C_{ext}$  = concentração extraída de carbendazim;  $V_{ext}$  = volume do extrato final.

### **3.4.5 Validação do método DPX de carbendazim de suco de laranja**

O método DPX de extração de resíduos do carbendazim de suco de laranja empregando o sorvente Si(PGPMS) foi validado de acordo com o protocolo de validação de métodos de determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos proposto pela Comunidade Europeia – documento SANTE/11813/2017 (SANTE, 2017). O protocolo europeu é o mais empregado e reconhecido dentre aqueles que fazem referência a metodologias analíticas para determinação de resíduos de agrotóxicos, por apresentar critérios rigorosos e bem estabelecidos para aceitação dos parâmetros analíticos de uma metodologia. Os parâmetros validados na metodologia analítica proposta neste trabalho foram: linearidade, faixa dinâmica linear, seletividade/especificidade, limite de quantificação, exatidão e precisão (repetibilidade, reproduzibilidade dentro do laboratório).

#### **3.4.5.1 Linearidade**

A linearidade do método DPX foi estudada a partir da injeção de soluções padrões de carbendazim preparados em água ultrapura e na matriz da amostra, em diferentes concentrações, no sistema CLAE-DAD. O menor nível de concentração do estudo de linearidade foi definido pelo limite de quantificação do carbendazim. A partir das áreas de picos do carbendazim nos diferentes níveis de concentração foram construídas curvas

analíticas e, a partir da regressão linear, o coeficiente de correlação (r) foi determinado. A linearidade foi considerada aceitável quando o r obtido foi maior que 0,99 (ANVISA, 2017).

### 3.4.5.2 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) é o menor nível de concentração dos resíduos de carbendazim encontrados no suco de laranja que atende aos critérios de desempenho do método quanto à exatidão e precisão. Isto é, o LOQ é a menor concentração determinada pelo método DPX com exatidão na faixa de 70-120% e com desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*) inferior a 20 %. Para a determinação do LOQ do método (LOQ<sub>met</sub>), inicialmente foi determinado o LOQ do instrumento (LOQ<sub>inst</sub>). Soluções padrão de carbendazim foram injetadas em triplicata e em ordem decrescente de concentração até a obtenção do menor sinal para cada composto capaz de ser quantificado com exatidão e precisão pelo método DPX, dentro dos critérios definidos anteriormente. O LOQ<sub>met</sub> para o carbendazim foi determinado a partir do uso da Equação 2.

$$LOQ_{met} = \frac{LOQ_{inst}}{FC} \quad \text{Equação 2}$$

LOQ<sub>met</sub> = limite de quantificação do método; LOQ<sub>inst</sub> = limite de quantificação do instrumento, e;

FC = fator de concentração do método.

### 3.4.5.3 Seletividade do método

A seletividade do método foi avaliada a partir da análise do branco de três diferentes amostras de suco de laranja sem e com a fortificação do carbendazim, com as soluções-padrão em concentrações correspondentes à 1,0 µg mL<sup>-1</sup> - limite máximo residual para o carbendazim em laranja (FAO, 2018) - e comparada com a análise da solução padrão preparada em reagente na mesma concentração. Além da análise visual, as áreas dos picos de cada composto obtidas na amostra em branco fortificada e na solução-padrão reagente na mesma concentração foram comparadas, sendo o método aceito como seletivo caso a diferença entre a área do pico fosse menor que 30 % (SANTE, 2017).

#### 3.4.5.4 Exatidão

A exatidão do método foi determinada a partir da recuperação dos resíduos de agrotóxicos, fortificados com 3 (três) diferentes concentrações ( $2x$ ,  $3,5x$  e  $5x$  LOQ<sub>met</sub>), de amostras de suco de laranja submetidas ao processo de extração em fase sólida, empregando os cartuchos Si(PGPMS). Todo o procedimento foi realizado em 5 (cinco) replicatas para cada nível de concentração avaliado. O método foi considerado exato quando a recuperação obtida ficou na faixa de 70 a 120 % da fortificação inicial.

#### 3.4.5.5 Precisão

Para o estudo de precisão do método DPX proposto neste trabalho, dois parâmetros de desempenho foram avaliados: (i) a repetibilidade e (ii) a reproduutibilidade dentro do laboratório, conforme orientações do documento SANTE/11813/2017.

##### *3.4.5.5.1 Repetibilidade*

A repetibilidade do método DPX foi avaliada a partir da análise de extratos de suco de laranja fortificados em 3 (três) níveis de concentração do carbendazim ( $2x$ ,  $3,5x$  e  $5x$  LOQ<sub>met</sub>), empregando o procedimento otimizado, sob controle rigoroso das condições experimentais para que não houvesse quaisquer alterações de uma extração para outra (p.ex., mesmo analista, mesmo dia, etc.). Todo o procedimento foi realizado em 5 (cinco) replicatas. O método é considerado preciso quando o RSD das medidas ficar abaixo de 20 % (SANTE/11813/2017).

##### *3.4.5.5.2 Reproduutibilidade dentro do laboratório*

A precisão do método foi avaliada também com relação à reproduutibilidade dentro do laboratório, também conhecida como precisão intermediária (ANVISA, 2017), na qual uma das condições experimentais foi modificada de um conjunto de medidas para outro. A condição experimental alterada foi o dia da realização da extração dos resíduos de agrotóxicos das amostras de água. Para tal, o procedimento de extração DPX do carbendazim de suco de laranja otimizado foi repetido em três dias distintos. O método é considerado

reprodutível dentro do laboratório quando o RSD entre os dias para os extratos for inferior a 20 % (SANTE/11813/2017).

### ***3.4.6 Aplicação do método DPX na extração de carbendazim de amostras de suco de laranja***

O método DPX com o sorvente Si(PGPMS), após otimizado e validado, foi aplicado na determinação de carbendazim em 5 amostras de suco de laranja obtidas no comércio local de Ituiutaba/MG, fortificando-as com  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de solução padrão de carbendazim. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas pelo método proposto e por um método QuEChERS (RIZZETTI *et al.*, 2016). Resumidamente, 5,0 mL de amostra de suco de laranja foram transferidos para um tubo de centrífuga de 50 mL. 5,0 mL de acetonitrila acidificada com 50 microlitros de ácido acético foram então adicionados ao tubo, sendo estes agitados por 1 min. Em seguida, 2,0 g de MgSO<sub>4</sub> e 0,85 g de acetato de sódio foram adicionados e os tubos agitados por 1 min, sendo posteriormente centrifugados a 2500 r.p.m. por 8 min. Para a etapa de limpeza, 2,0 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo eppendorf contendo 20 mg de PSA and 75 mg de MgSO<sub>4</sub> anidro. A mistura foi agitada por 1 minuto. Em seguida, 1,0 mL do sobrenadante foi colocado em um frasco apropriado e analisado por CLAE-DAD.

## **3.5 Condições cromatográficas de análise**

A quantificação dos resíduos de carbendazim nos extratos dos sucos de laranja foi realizada em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência no modo de fase reversa, empregando detecção por arranjo de diodos (DAD) (Fernandes, Oliveira, Chaves, 2018). As condições de análises empregadas para a determinação dos resíduos de carbendazim foram:

- Comprimento de onda de detecção no ultravioleta: 285 nm;
- Eluição no modo isocrático: ACN:solução aquosa de anidrido trifluoracético (TFAA) a 0,1% (15:85, v/v);
- Coluna comercial X-Bridge de 125 mm por 4,6 mm de diâmetro interno recheada com partículas de 5  $\mu\text{m}$  de C<sub>18</sub> quimicamente ligado à sílica com ponte metilênica (Waters).

As medidas cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a líquido com sistema quaternário de distribuição de solventes modelo Alliance e2695 da Waters com

detecção por arranjo de diodos PDA 2695 e sistema de injeção automático. O registro, a integração e aquisição de dados foram realizados pelo software Empower3®.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

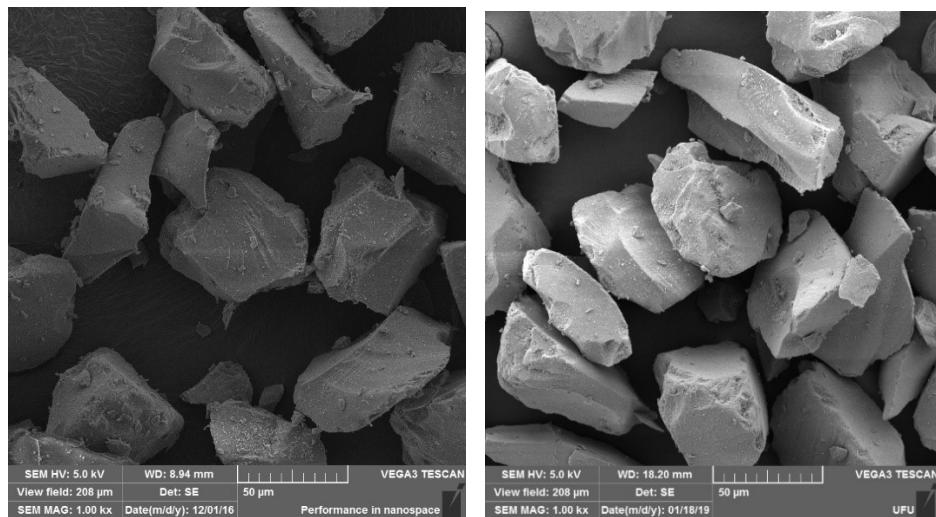
### 4.1 Caracterização físico-química do Si(PGPMS)

O sorvente Si(PGPMS) foi preparado com o intuito de obter um material com polaridade moderada para a retenção de compostos moderadamente polares, assim como o carbendazim, que possui um coeficiente de partição ( $\log P$ ) de 1,46. Quanto maior o valor do  $\log P$  maior a hidrofobicidade do composto, comparativamente o carbendazim possui  $\log P$  próximo aos de éter di-isopropílico (1,51), 1-pentanol (1,51), fenol (1,50), benzaldeído (1,48), ácido feniletanóico (1,41), etc. (SANGSTER, 1989). A polaridade do material será fornecida pelo grupamento glicidóxi presente na estrutura do polímero PGPMS, possibilitando uma maior interação com grupamentos polares presentes nos analitos. Após a preparação do sorvente, porções do material foram submetidas a diferentes técnicas para caracterização de suas principais propriedades.

#### 4.1.1 Microscopia eletrônica de varredura

O sorvente Si(PGPMS) foi avaliado quanto à sua morfologia a partir da obtenção das micrografias por microscopia eletrônica de varredura. A Figura 5 apresenta as micrografias eletrônicas das partículas do sorvente Si(PGPMS) e da sílica pura sem modificação.

Figura 5. Micrografias eletrônicas de varredura da (a) sílica pura e do (b) sorvente Si(PGPMS).



De uma forma geral, observa-se que as partículas de sílica apresentam formato irregular e que não sofreram mudanças significativas com a incorporação da camada polimérica do PGPMS. Além disso, a camada polimérica não promove a aglomeração das partículas, o que poderia levar a uma distribuição não uniforme do fluxo de solventes pelas partículas do sorvente, quando dispostas dentro da ponteira descartável de micropipeta, na aplicação do método DPX. Além disso, a maior disponibilidade dos sítios ativos no material não aglomerado, possibilita às moléculas do carbendazim acesso a estes sítios ativos do sorvente, promovendo maior remoção dos resíduos do agrotóxico das amostras de suco de laranja.

#### 4.1.2 Análise de área superficial e porosidade

As partículas de Si(PGPMS) foram submetidas a medidas de adsorção de nitrogênio para determinação de suas área superficial e propriedades de poros. A área superficial ( $S_{BET}$ ) foi determinada pelo método BET (Brunauer, Emmett e Teller) e as propriedades de poros a partir do método de ponto único na dessorção total do volume de nitrogênio dos poros das partículas. As medidas foram realizadas nas partículas de sílica antes e após a etapa de imobilização do PGPMS e os resultados estão apresentados na Tabela 6.

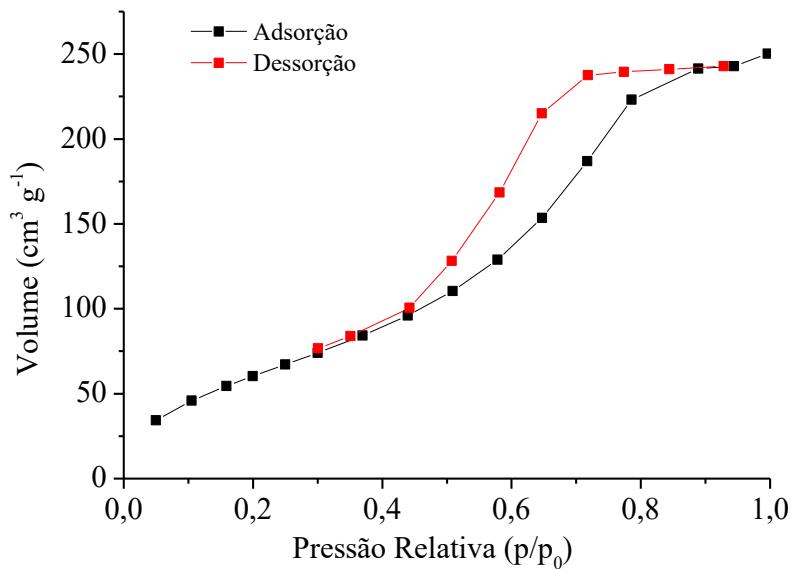
Tabela 6. Área superficial específica ( $S_{BET}$ ), volume ( $V_p$ ) e diâmetro de poros ( $d_p$ ) das partículas de sílica pura e do sorvente Si(PGPMS).

Material	$S_{BET}$ ( $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$ )	$V_p$ ( $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$ )	$d_p$ (nm)
$\text{SiO}_2$	440	0,77	7,0
Si(PGPMS)	250	0,38	6,1

De acordo com a Tabela 6, observa-se que a deposição e imobilização do PGPMS ocorre na superfície e poros da sílica, levando a uma redução de 45 % da área superficial específica das partículas de sílica no sorvente preparado no laboratório. Além disso, o diâmetro médio de poro é reduzido na ordem de 0,9 nm, em média, sugerindo que esta seja a espessura da camada polimérica formada na superfície e poros da sílica. A deposição do polímero PGPMS nos poros da sílica leva a uma redução do volume total dos poros de 50 %, não os preenchendo totalmente, que é uma característica vantajosa para o sorvente no processo de extração posteriormente, uma vez que promove processos rápidos de transferência de massa.

A isoterma de adsorção de N<sub>2</sub> obtida para o sorvente Si(PGPMS) durante a obtenção das suas propriedades morfológicas está apresentada na Figura 6.

Figura 6. Isoterma de adsorção e dessorção de N<sub>2</sub> no sorvente Si(PGPMS).

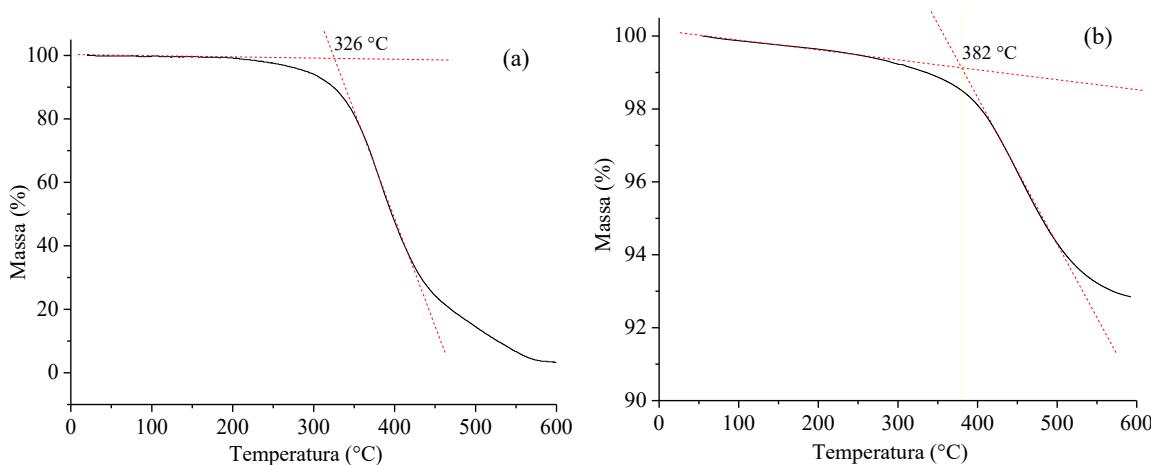


A isoterma de adsorção de N<sub>2</sub> nas partículas Si(PGPMS), Figura 6, indica um perfil de isoterma do tipo IV, característica de materiais mesoporosos (2-50 nm), confirmado pelo diâmetro médio de poros na Tabela 6. Além disso, a isoterma de adsorção apresenta uma histerese do tipo H1, indicando que o Si(PGPMS) apresenta poros cilíndricos e abertos, não bloqueados, característica desejável para um sorvente que será aplicado na remoção de resíduos de agrotóxicos de amostras líquidas, facilitando o acesso do analito aos sítios ativos internos do sorvente.

#### 4.1.3 Análise termogravimétrica

O Si(PGPMS) foi também caracterizado quanto à sua estabilidade térmica e quanto ao teor de PGPMS immobilizado nas partículas de sílica através de análise de porções do sorvente por um analisador termogravimétrico. Curvas termogravimétricas (TG) para o polímero PGPMS e para o sorvente são registradas na Figura 7.

Figura 7. Curvas TG para o polímero (a) PGPMS e para (b) o sorvente Si(PGPMS).

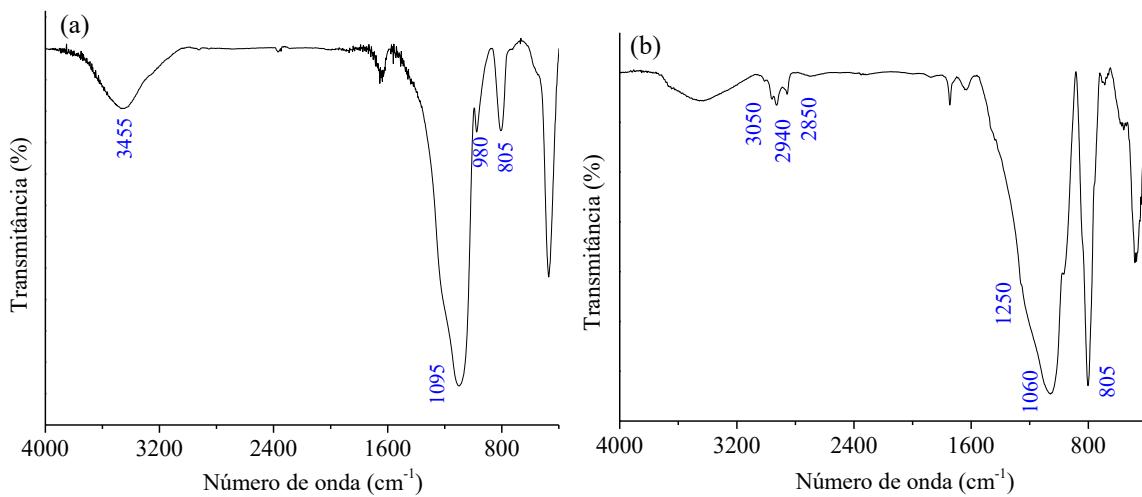


Pela análise das curvas TG da Figura 7, observa-se que o perfil termogravimétrico do sorvente possui similaridade com o perfil do polímero PGPMS. O polímero apresenta estabilidade térmica até cerca de 210 °C, quando então se observa o início da perda de massa do PGPMS, tendo uma perda mais acentuada a partir de 326 a 600 °C, indicando a mineralização total do polímero nessa temperatura (Figura 7a). No sorvente ocorre um aumento da estabilidade do PGPMS promovida pela interação com a superfície da sílica, tendo início de maior perda de massa em 382 °C (Figura 7b). Essa perda é precedida de uma perda de massa branda e contínua provavelmente associada a volatilização de solvente de preparação do sorvente que se encontrava ocluído no material. A perda de massa referente ao PGPMS no sorvente equivale a 6,8 % da massa total, o que provavelmente está associado à quantidade de PGPMS imobilizada na sílica. O resíduo de material a 600 °C (92,6 %) na curva TG do sorvente está relacionado à sílica, que não é degradada até 600 °C. Portanto, pela curva TG pode-se indicar cerca de 6,8 % de PGPMS imobilizado no sorvente Si(PGPMS).

#### 4.1.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

A presença de grupos funcionais do polímero PGPMS que confirmam sua imobilização na superfície da sílica foi determinada por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV). Para fins de comparação, uma amostra da sílica pura foi também analisada. Os espectros IV obtidos para o sorvente e para a sílica pura são mostrados na Figura 8.

Figura 8. Espectros de absorção na região do infravermelho (a) da sílica nua e (b) do sorvente Si(PGPMS).



De acordo com os espectros IV da Figura 8 da sílica e do Si(PGPMS), são registrados e destacados os principais estiramentos e vibrações dos grupos funcionais presentes nos materiais. A Tabela 7 apresenta as atribuições para os sinais de absorção mais importantes registrados para o sorvente Si(PGPMS).

Tabela 7. Principais atribuições das bandas dos espectros vibracionais do Si(PGPMS) na região do infravermelho.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuições
3455	Estiramento da ligação O-H de grupos SiOH e de moléculas de água fisicamente adsorvidas na sílica
3050	Estiramento da ligação C-H de anéis epóxi
2940	Estiramento da ligação C-H de grupos CH <sub>3</sub>
2850	Estiramento da ligação C-H de grupos CH <sub>2</sub>
1250	Estiramento simétrico C-O-C
1090	Estiramento assimétrico Si-O-Si
980	Estiramento vibracional Si-OH
805	Estiramento simétrico Si-O-Si

A imobilização do PGPMS sobre a sílica pode ser confirmada principalmente pelos sinais registrados na região compreendida entre 2850-3050 cm<sup>-1</sup> e pelo alargamento do pico intenso registrado em torno de 1100 cm<sup>-1</sup>. O sinal em 3050 cm<sup>-1</sup>, em específico, é atribuído ao estiramento C-H de grupamentos epóxi, presente na estrutura monomérica do PGPMS, confirmando que o material orgânico imobilizado na sílica se trata do polímero. Além disso,

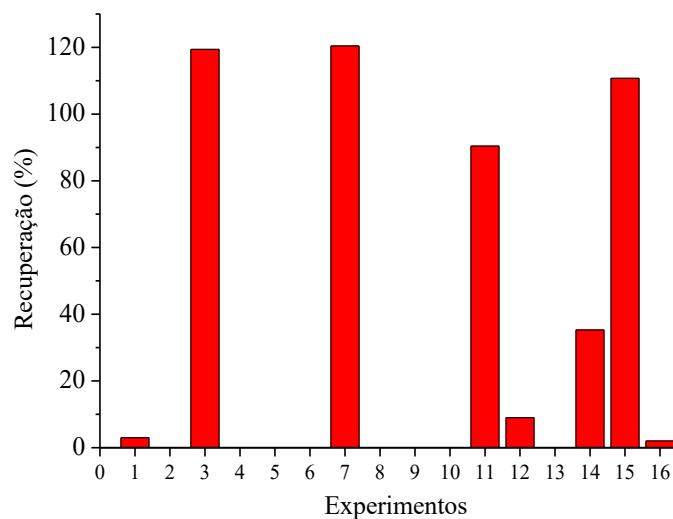
o sinal registrado em 1090 cm<sup>-1</sup> no espectro do sorvente Si(PGPMS) se apresenta mais alargado que o do espectro da sílica pura. Este fato está associado à sobreposição do sinal atribuído ao estiramento C-O-C, que é registrado em 1250 cm<sup>-1</sup>, ao sinal do estiramento assimétrico Si-O-Si da sílica, causando um alargamento do pico no espectro. A ligação C-O-C está presente no anel epóxi e na ligação entre o anel epóxi e o grupamento propílico ligado à cadeia siloxano do polímero, conforme mostrado na Figura 3.

## 4.2 Otimização do método DPX para extração de carbendazim de suco de laranja

### 4.2.1 Planejamento fatorial fracionário 2<sup>7-3</sup>

O desenvolvimento do método DPX para a extração do carbendazim de sucos de laranja foi iniciado com a seleção de variáveis que efetivamente afetavam a porcentagem de recuperação do agrotóxico da matriz da amostra. Um planejamento fatorial fracionário foi então escolhido para avaliar a influência de diferentes condições experimentais (variáveis) no processo de extração do carbendazim de suco de laranja, com o objetivo de avaliar uma grande quantidade de variáveis, porém realizando um número relativamente reduzido de experimentos. A Figura 9 apresenta as recuperações percentuais obtidas para os experimentos realizados nas condições descritas na Tabela 3.

Figura 9. Recuperações de carbendazim do suco de laranja após a extração DPX delineada de acordo com o planejamento fatorial fracionário 2<sup>7-3</sup>.

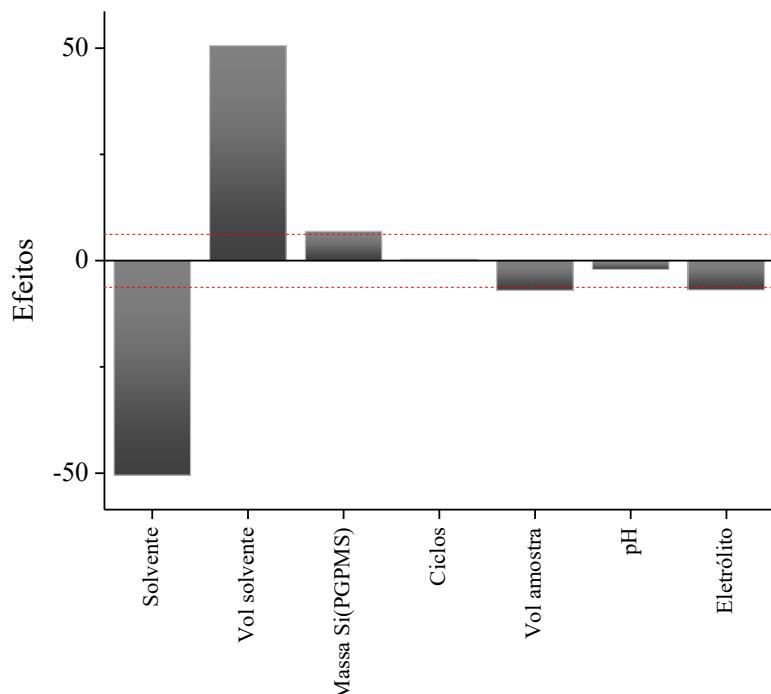


Conforme pode ser observado no gráfico da Figura 9, alguns experimentos não resultaram em extrações do carbendazim, indicando que algumas variáveis podem influenciar negativamente no processo de remoção do carbendazim do sorvente, ou até mesmo, impedir que o carbendazim seja retido no sorvente. Para avaliar a importância de cada uma das variáveis estudadas no planejamento fatorial fracionária  $2^{7-3}$  para a extração DPX de carbendazim de suco de laranja, foram calculados os seus efeitos principais. O efeito de uma variável é obtido pela diferença entre a média das recuperações de carbendazim no nível (+) e a média das recuperações no nível (-) daquela variável, conforme a Equação 3.

$$E_f = \bar{R}_{(+)} - \bar{R}_{(-)} \quad \text{Equação 3}$$

Aplicando a equação de cálculo de efeitos para as sete variáveis, obtém-se valores que correspondem à significância dos efeitos, ou seja, quanto maior o valor de efeito maior a importância da variável no processo de extração DPX. A Figura 10 apresenta o gráfico de Pareto com os valores de efeitos para as variáveis principais estudadas no planejamento fatorial fracionário  $2^{7-3}$ .

Figura 10. Efeito das variáveis no processo de extração DPX de resíduos carbendazim de suco de laranja, empregando Si(PGPMS).



De acordo com o planejamento fatorial fracionário as principais variáveis que afetam a extração de carbendazim de suco de laranja pelo método DPX com o sorvente Si(PGPMS) são o solvente e o volume de solvente, que possuem os maiores efeitos na recuperação do agrotóxico. Como o solvente é uma variável qualitativa, pode-se fixar no nível de maior resposta, que para a recuperação do carbendazim foi o metanol acidificado (nível menos). O aumento do volume de solvente extrator resulta em melhores rendimentos de recuperação, valor positivo para o efeito na Figura 10. Além disso, outras variáveis que apresentaram influência significativa na resposta, porém com menores valores de efeitos, foram a massa de sorvente, o volume de amostra e a adição de eletrólito. Para estas variáveis, uma maior massa de sorvente (efeito positivo), um menor volume de amostra (efeito negativo) e a não adição de eletrólito (efeito negativo) indicaram maiores influências na recuperação do carbendazim. Apesar da adição de eletrólito ter indicado menor recuperação do carbendazim, é importante mencionar que mesmo as amostras que não foram adicionadas massas de eletrólitos na avaliação desta variável, elas já continham eletrólito pelo tamponamento da amostra de suco de laranja com solução de acetato ou fosfato de sódio. A adição do eletrólito pode levar a um aumento da retenção do carbendazim no sorvente, através da solvatação dos íons do eletrólito por moléculas de água que são deslocadas da solvatação das moléculas do carbendazim, deixando-as disponíveis para interagir com os sítios do sorvente. Assim, ao realizar o estudo preliminar sem controlar o pH da amostra e adicionando 50 mg de KCl foi observada uma maior recuperação do carbendazim quando comparada com extração sem adição do eletrólito. Como a adição de eletrólito era uma variável qualitativa, foi mantida a adição de 50 mg de KCl nas amostras de suco de laranja para os estudos posteriores de otimização. Uma vez que o pH da amostra não indicou influência no processo de extração DPX e decidiu-se não fixar o pH do suco de laranja.

Neste estudo foi observado também que a variável de menor influência no processo de extração do carbendazim foi o número de ciclos, ou seja, um número maior de ciclos não afeta a recuperação do agrotóxico, provavelmente porque o adsorvente apresentou seletividade pelo carbendazim, retendo-o adequadamente na etapa de eluição da amostra e o metanol acidificado foi capaz de dessorvê-lo totalmente na etapa de eluição do carbendazim do sorvente. Essa condição é vantajosa, pois o processo de extração DPX otimizado requer um número menor de etapas comparado a outros métodos que são empregados para extração do carbendazim de suco de laranja, além do sorvente Si(PGPMS) apresentar retenção adequada para o carbendazim.

Desta forma, as variáveis que foram definidas para o estudo de otimização do processo de extração DPX em um planejamento composto central foram o volume de solvente extrator, o volume de amostra e a massa de sorvente Si(PGPMS), fixando o metanol acidificado com solvente extrator, adição de 50 mg de KCl, um ciclo de extração e o pH natural do suco de laranja.

#### 4.2.2 *Planejamento composto central*

As três variáveis selecionadas no estudo anterior foram submetidas ao processo de otimização, para obtenção de seus níveis que proporcionassem maior recuperação de carbendazim do suco de laranja, empregando um planejamento composto central (planejamento fatorial  $2^3$  + triplicata no ponto central + planejamento axial). Ao total foram realizados 17 (dezessete) experimentos, combinando todos os níveis das variáveis (matriz de planejamento, Tabela 5, (página 33), e os resultados de recuperação para o carbendazim em cada experimento é apresentado na Tabela 8.

Tabela 8. Recuperação de resíduos de carbendazim em suco de laranja, empregando um planejamento composto central.

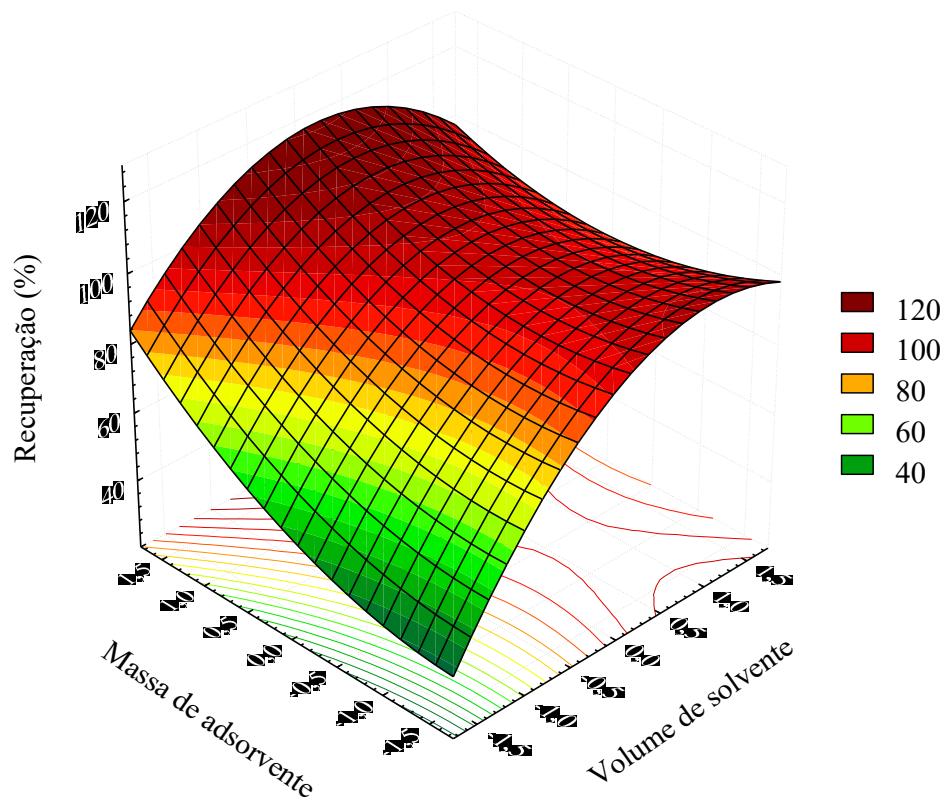
Exp.	R (%)	Exp.	R (%)	Exp.	R (%)
17	81,9	23	73,3	29	109,5
18	96,5	24	78,9	30	96,7
19	106,7	25	107,4	31	125,9
20	100,5	26	106,7	32	90,8
21	63,3	27	101,8	33	79,0
22	78,5	28	41,7		

De uma forma geral, como apresentado na Tabela 8, os resultados de recuperação do carbendazim em suco de laranja ficaram na faixa de 70-120%, recomendada para resíduos de agrotóxicos em matrizes alimentícias. A exceção se deu para o experimento 28 em que o volume de solvente extrator empregado foi de apenas 0,6 mL, se mostrando insuficiente para uma extração eficiente do carbendazim. Os experimentos 21 e 31, apesar de fora da faixa, ficaram próximos. Os experimentos 25, 26 e 27, que se trataram da triplicata no nível intermediário das três variáveis, foram os únicos que empregaram condições idênticas de realização e, portanto, o desvio padrão relativo (RSD, *relative standard deviation*) dessas medidas indica o grau de variação da resposta do planejamento composto central. O RSD

obtido para essas medidas foi de 2,90 %, indicando uma baixa dispersão dos resultados de recuperação quando o mesmo procedimento de extração DPX é realizado em repetições.

A otimização do volume de solvente extrator, massa de Si(PGPMS) e volume de amostra foi realizada através da aplicação da metodologia de superfície de respostas aos resultados de recuperação de resíduos de carbendazim pelo método DPX obtidos nos experimentos do planejamento composto central. Três superfícies de respostas, que representam as combinações entre duas variáveis e as respostas, foram construídas para a obtenção das condições experimentais que levam às maiores recuperações de carbendazim. Estas superfícies estão apresentadas nas Figura 11 a Figura 13.

Figura 11. Superfície de respostas para a recuperação de carbendazim de suco de laranja empregando extração na ponteira descartável com o sorvente Si(PGPMS). Variáveis sob otimização: massa de adsorvente e volume de solvente extrator.

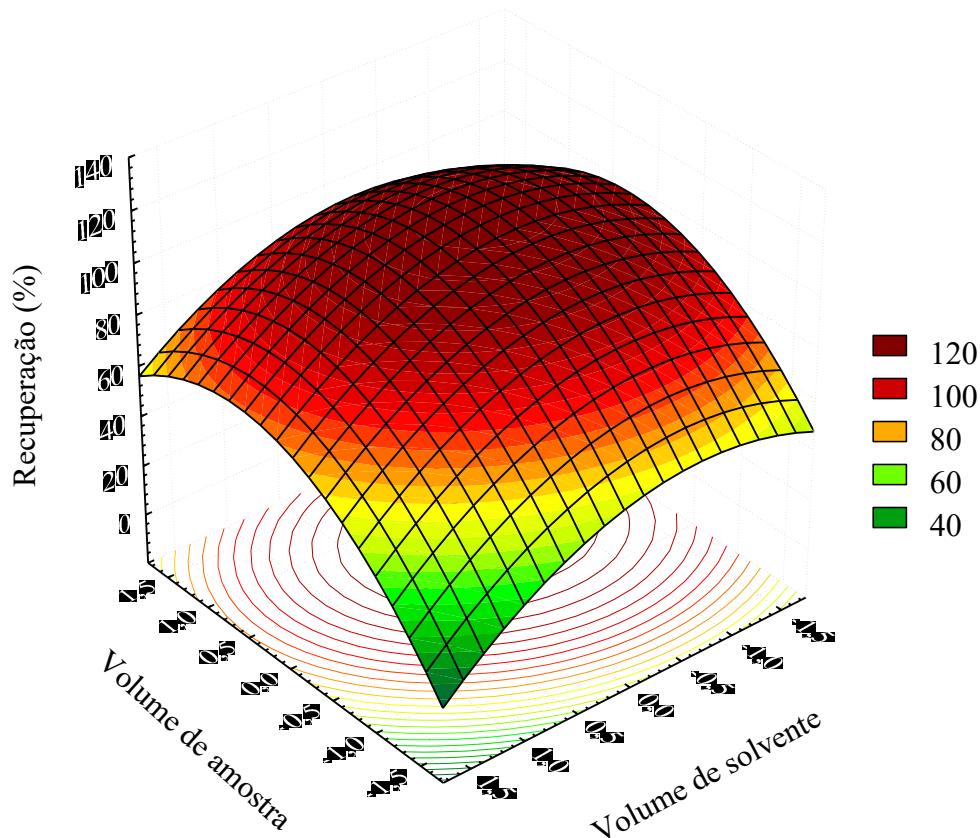


A primeira superfície de resposta apresenta a relação entre o volume de metanol acidificado e a massa de Si(PGPMS) empregados no processo de extração DPX do carbendazim de suco de laranja, Figura 11. Os valores de maior recuperação de resíduos de carbendazim foram obtidos quando a massa de adsorvente foi a maior possível, devido à

maior capacidade de adsorção do sorvente em virtude do maior número de sítios ativos disponíveis para a retenção do carbendazim. No entanto, os volumes de metanol acidificado que apresentaram maiores recuperações de carbendazim foram os maiores que 1,5 mL, volumes de metanol inferiores não apresentaram eficiência para a extração do carbendazim. Como pode ser observado na superfície de resposta da Figura 11, a recuperação dos resíduos de carbendazim apresenta maior dependência do volume de solvente que propriamente da massa de adsorvente, quanto menor o volume de solvente extrator menor é a recuperação do carbendazim. Independente da massa de Si(PGPMS) empregada, a recuperação do carbendazim do suco de laranja alcança no máximo 80 %. Recuperações em torno de 100 % foram obtidas quando o volume de solvente foi superior a 1,5 mL.

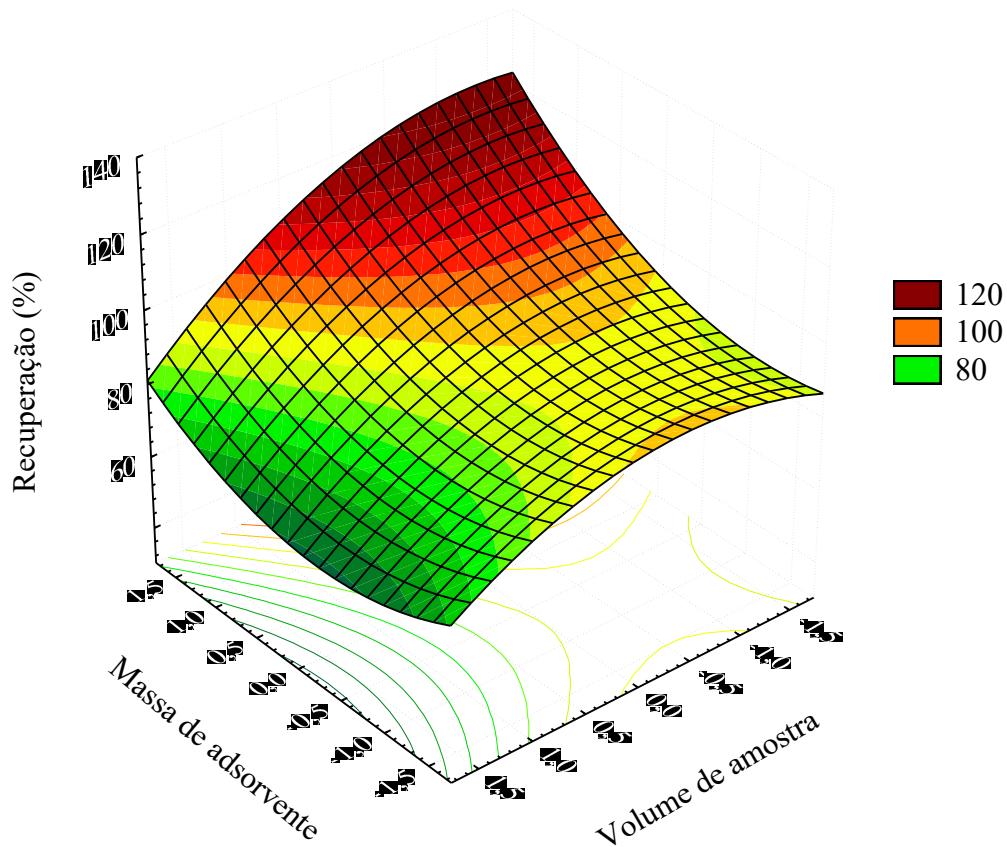
A superfície de resposta que relaciona a influência dos volumes de amostra e de solvente extrator na recuperação dos resíduos de carbendazim do suco de laranja está apresentada na Figura 12. Nesta superfície de resposta observa-se que o máximo de recuperação do carbendazim (região de coloração vermelha mais escura) ocorre quando o volume de metanol acidificado corresponde a 1,25 mL (nível -0,5) e o volume de amostra de suco de laranja eluído pela ponteira descartável preenchida com o sorvente foi de 1,75 mL (nível +0,5). A recuperação alcança os 100 % nessa condição e registra pequena variação quando os volumes empregados de solvente extrator ficam na faixa de 1,00 a 1,75 mL (níveis -1,0 a +0,5) e volumes de amostras de suco de laranja na faixa de 1,50 a 2,00 mL (níveis 0,0 a +1,0).

Figura 12. Superfície de respostas para a recuperação de carbendazim de suco de laranja empregando extração na ponteira descartável com o sorvente Si(PGPMS). Variáveis sob otimização: volume de amostra e volume de solvente extrator.



A relação entre a massa de adsorvente Si(PGPMS) e o volume de suco de laranja empregados no método DPX está representada na superfície de resposta da Figura 13. Pelos resultados da superfície de resposta, observa-se que quanto maior a massa de adsorvente e menor o volume de amostra, maior a taxa de recuperação do carbendazim. Esse resultado era esperado uma vez que quanto maior a disponibilidade de sítios ativos e menor a quantidade de soluto, mais eficiente é a retenção desses solutos nos sítios ativos do sorvente. Desta forma, quanto menor o volume de suco de laranja fortificado, menor a quantidade de resíduos de carbendazim e que, por sua vez, são mais eficientemente retidos em uma maior massa de Si(PGPMS), por possuir maior número de sítios ativos disponíveis.

Figura 13. Superfície de respostas para a recuperação de carbendazim de suco de laranja empregando extração na ponteira descartável com o sorvente Si(PGPMS). Variáveis sob otimização: volume de amostra e massa de adsorvente.



Com base nas informações obtidas pelas superfícies de respostas das Figuras 11 a 13, definiu-se como as melhores condições para extrair os resíduos de carbendazim das amostras de suco de laranja uma massa de 200 mg de sorvente Si(PGPMS), 1,50 mL de suco de laranja e 1,50 mL de solvente de eluição metanol acidificado com 1% de HNO<sub>3</sub>. Essas condições foram empregadas para a extração dos resíduos de carbendazim de suco de laranja no estudo de validação do método.

Além da simplicidade do preparo do sorvente, visto que é necessário apenas o uso do agitador magnético e de um forno sem controle rigoroso das condições experimentais, e da facilidade de aplicação do Si(PGPMS) no interior da ponteira descartável, requerendo apenas um pedaço pequeno algodão comercial (~1 mg) como retentor das partículas, o método DPX desenvolvido para a extração do carbendazim de sucos de laranja se apresentou com alta frequência analítica, mais de 20 extrações/hora, com boas taxas de recuperação e baixa dispersão dos resultados. As condições experimentais otimizadas do método foram:

**massa de sorvente de 0,200 g de Si(PGPMS), volume de amostra de 1,5 mL e o volume de solvente 1,5 mL.** O volume de amostra empregado no método DPX proposto pode ser considerado pequeno quando se compara a outros trabalhos que empregaram diferentes métodos de extração de carbendazim de suco de laranja. Essa condição se torna uma vantagem frente a amostras de laranja com pouco néctar disponível ou para amostras que já foram parcialmente consumidas e foram coletadas como prova de contaminação. Barahona *et al.* (2010) empregaram a microextração em fase líquida (LPME, *liquid phase microextraction*) com fibra oca para extrair três fungicidas, dentre eles o carbendazim, de suco de laranja. Apesar do método não fazer uso de volumes significativos de solventes de eluição, necessita de aparato de disponibilidade limitada (microsseringa específica contendo uma fibra oca porosa no interior da agulha), bem como empregou volumes de amostra duas vezes maiores que o do presente trabalho. Como se trata de um método de extração na condição de equilíbrio, a recuperação do carbendazim das amostras de suco de laranja alcançada pelos autores ficou na faixa de 17 a 22 %.

Young *et al.* (2001) empregaram a extração em fase sólida com cartuchos recheados com mistura de sorventes mistos (com partículas de um material de fase reversa e de um trocador forte de cátions) para fornecer a seletividade adequada para remoção de resíduos de carbendazim e tiabendazol de sucos de laranja, uva e maçã. As recuperações alcançadas para o carbendazim ficaram na faixa de 84 a 91% e os autores empregaram 10 mL de amostras de suco de laranja com eluição de metanol alcalinizado com hidróxido de amônio. Um volume de amostra cerca de 6 vezes maior que o empregado no método DPX proposto, bem como uma massa de adsorvente de 6 g nos cartuchos, 30 vezes maior que a massa de Si(PGPMS) na ponteira da micropipeta.

Radisic *et al.* (2009) empregaram a extração por dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) para extração de resíduos de agrotóxicos de sucos de frutas, dentre eles o carbendazim em suco de laranja. No método de extração proposto pelos autores, foram necessários 10 mL de amostra e pelo menos 1 g de material adsorvente, terra diatomácea, além do maior envolvimento do analista na preparação da amostra as quantidades empregadas pelos autores foram superiores ao otimizado no método DPX.

Rizzetti *et al.* (2016) empregaram o método QuEChERS para extrair diversos resíduos de agrotóxicos de suco de laranja, entre esses o carbendazim. Apesar de consolidado, o método QuEChERS envolve um número maior de etapas quando comparado com o método DPX. Além disso, os autores empregaram 10 mL de amostras de suco e 10 mL de solvente extrator, obtendo recuperação do carbendazim na faixa de 77 a 99 %.

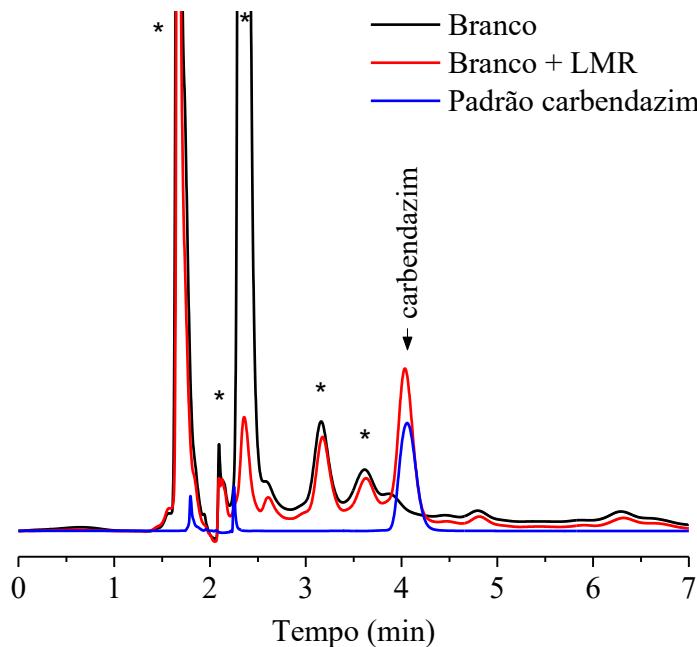
Frente aos trabalhos citados, pode-se destacar como vantagem do método DPX o uso de apenas o sorvente Si(PGPMS) e o solvente de eluição, não requerendo etapa adicional de limpeza, necessária em praticamente todos os métodos disponíveis na literatura para extração de carbendazim de suco de laranja.

### 4.3 Validação do método DPX

#### 4.3.1 Seletividade/especificidade

A seletividade do método foi determinada de acordo com a recomendação do documento SANTE/11813/2017 (SANTE, 2017). Amostras de suco de laranja fortificadas com carbendazim em  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  (limite máximo residual, LMR, estabelecido pela FAO), bem como amostras de suco de laranja não fortificadas foram submetidas ao processo de extração DPX e os extratos obtidos foram analisados por CLAE-DAD. Os cromatogramas dos extratos do branco e de uma das amostras fortificadas com carbendazim foram obtidos e estão apresentados na Figura 14.

Figura 14. Cromatogramas sobrepostos para análise de uma amostra em branco (submetida ao processo de extração); uma amostra do branco fortificada com solução padrão de carbendazim no LMR, e; de uma solução padrão de carbendazim em metanol na concentração do LMR. Condições de análise vide seção 3.5.



De acordo com o Documento SANTE/11813/2017, o método pode ser considerado seletivo/específico desde que o pico do analito não seja comprometido com a presença de interferentes da amostra no mesmo tempo de retenção e que sua área não sofra uma variação significativa. Na Figura 14 os cromatogramas dos extratos do branco e da amostra fortificada foram comparados com o cromatograma de uma solução padrão de carbendazim na mesma concentração de fortificação. Observa-se visualmente que não há a coeluição de picos no tempo de retenção do carbendazim, em 4,010 min. Os picos registrados, principalmente nos cromatogramas das amostras, anteriores a esse tempo estão relacionados a componentes da matriz do suco de laranja que são coextraídos pelo método juntamente ao carbendazim. Após realizar a integração do pico do carbendazim no branco fortificado e o pico da solução padrão de carbendazim na mesma concentração, as áreas registradas se diferenciaram em apenas 0,6%, havendo uma perda da área do pico do carbendazim na amostra. Este resultado indica que o método DPX além de eficiente na extração do carbendazim do suco de laranja no limite máximo residual indicado no Codex Alimentarius (FAO, 2018), a análise por CLAE-DAD apresenta boa seletividade para o carbendazim, mesmo a amostra sendo considerada complexa, com constituintes que geram sinais no detector DAD. Dentre os componentes possíveis presentes na matriz do suco de laranja podem ser destacados: minerais, vitaminas, lipídios, aminoácidos, etc.

A resposta do carbendazim preparado em solvente e fortificado na matriz do suco de laranja, apresentada nos cromatogramas sobrepostos da Figura 14, é recomendada pelo documento SANTE/11813/2017 para avaliação do efeito de matriz. Como foi observado não há efeito matriz significativo na resposta do carbendazim. Para compensar a pequena interferência que pode ocorrer de uma amostra para outra, com a mudança da concentração dos componentes do suco de laranja, as curvas analíticas foram construídas na própria matriz.

#### **4.3.2 Limite de detecção e limite de quantificação**

O limite de detecção (LOD) do método DPX-CLAE-DAD para a determinação de carbendazim em suco de laranja foi determinado a partir da injeção de soluções padrão do agrotóxico com concentrações decrescentes até a obtenção do sinal, visualmente, três vezes maior que o nível de ruído da linha de base no tempo de retenção registrado para o carbendazim em 4,010 min. O limite de quantificação (LOQ) foi determinado pela injeção de uma solução padrão de carbendazim com a menor concentração capaz de ser quantificada,

registrando exatidão na faixa de 70-120% da concentração e uma precisão com RSD < 20 %. A Tabela 9 aponta os valores obtidos para o LOD e LOQ do método DPX-CLAE-DAD.

Tabela 9. Limites de detecção e de quantificação do método de extração DPX de resíduos de carbendazim de suco de laranja com quantificação por CLAE-DAD.

Agrotóxico	Limite de detecção ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Limite de Quantificação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	RSD (%)
Carbendazim	30,0	100,0	12,4

O LOQ obtido para o método DPX-CLAE-DAD, 0,1 ppm, é dez vezes menor que o LMR registrado para o carbendazim em laranja na lista do Codex Alimentarius (FAO, 2018) que é de 1 ppm, conforme indicado na Tabela 9. Essa condição é o suficiente para realizar as determinações em suco de laranja e avaliar se o mesmo encontra em conformidade ou contaminado de acordo com as recomendações internacionais definidas pela FAO. O LOD obtido para o método foi de  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ , relativamente alto se comparado com outros métodos desenvolvidos para a mesma finalidade, porém empregando sistemas de detecção mais sensíveis como a espectrometria de massas (LC-MS) ou espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS). Rizzetti *et al.* (2016) desenvolveram um método de determinação de resíduos de carbendazim de suco de laranja com um LOD de  $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$  em um sistema UHPLC-MS/MS. Boeris, Arancibia e Olivieri (2014) empregaram a cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD) para determinação de resíduos de carbendazim em suco de laranja, alcançando LOD de  $2,3 \mu\text{g L}^{-1}$ , com auxílio de ferramentas que discriminam o sinal do analito de interferentes como a resolução de curva multivariada.

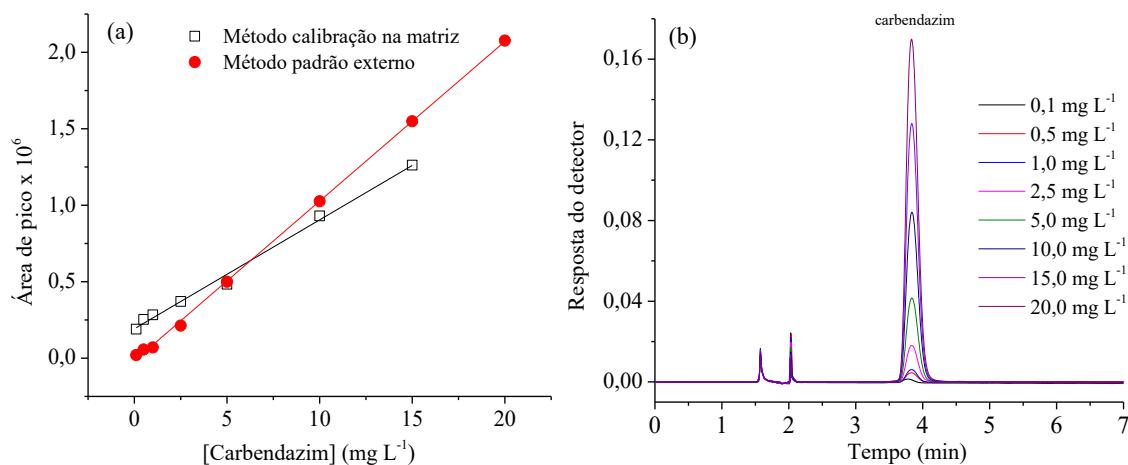
Apesar do LOD registrado para o método ser pelo menos dez vezes que estas referências, outros métodos reportados na literatura indicam valores de LOD para o carbendazim extraído de suco de laranja, ainda maior que o apresentado neste trabalho. Bedendo *et al.* (2012) alcançaram um limite de detecção de  $110 \mu\text{g L}^{-1}$  e limite de quantificação de  $330 \mu\text{g L}^{-1}$  para o carbendazim em suco de laranja, mesmo empregando um sistema mais sensível como LC-MS/MS.

No entanto, é importante dizer que o LOD e o LOQ do método DPX-CLAE-DAD podem ser reduzidos caso o solvente do extrato final seja evaporado e o extrato ressuspendido em um volume menor de solvente antes da medida instrumental, uma vez que no método proposto não há concentração do analito no extrato. São empregados os mesmos volumes de amostra e de solvente de eluição no método DPX, 1,50 mL.

#### 4.3.3 Linearidade e faixa de trabalho

A linearidade, a faixa de trabalho e a sensibilidade do método DPX foram determinadas a partir de parâmetros das curvas analíticas construídas para soluções padrão do carbendazim fortificados na matriz da amostra submetida ao processo de extração DPX. Curvas analíticas para o carbendazim foram construídas periodicamente para calibrar de forma adequada a resposta instrumental. Duas curvas analíticas, uma preparada em solvente (método padrão externo) e outra na própria matriz (método calibração na matriz), representativas do estudo são apresentadas na Figura 15a e os parâmetros analíticos obtidos a partir da curva preparada na matriz estão apresentados na Tabela 10. Os cromatogramas obtidos para os padrões das soluções de carbendazim empregadas para a construção das curvas analíticas são apresentados na Figura 15b.

Figura 15. (a) Curvas analíticas para o carbendazim preparado em solvente e na matriz da amostra extraída pelo método DPX otimizado. (b) Cromatogramas dos padrões de carbendazim empregados na construção da curva analítica.



A equação da reta, obtida a partir da regressão linear dos dados da Figura 15a, foi de  $S_{CBZ} = 0,0712 * [CBZ] + 0,1924$ . Em que:  $S_{CBZ}$  é a área de pico para o carbendazim e  $[CBZ]$  é a concentração do agrotóxico nos extratos das amostras obtidos pelo método DPX. O cruzamento das duas curvas analíticas na Figura 15a indica que existe um pequeno efeito matriz para o sinal do carbendazim, sendo esse efeito positivo para concentrações mais baixas e negativo para concentrações mais elevadas do carbendazim. Assim, para compensar

o efeito matriz, as curvas analíticas empregadas para quantificação do carbendazim neste trabalho foram calibradas no extrato da matriz da amostra.

Tabela 10. Parâmetros analíticos extraídos da curva analítica para o método DPX de resíduos de carbendazim de suco de laranja com quantificação por CLAE-DAD.

Agrotóxico	Faixa de trabalho ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Linearidade (r)	Sensibilidade ( $\text{mL } \mu\text{g}^{-1}$ )
Carbendazim	0,10 – 20,0	0,999	0,0125

A faixa de trabalho ou faixa dinâmica linear para o carbendazim foi definida a partir do LOQ até uma concentração de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  do agrotóxico. Apesar da resposta apresentar comportamento linear para concentrações maiores, a faixa de concentrações estabelecida neste trabalho é suficiente para a determinação do teor de carbendazim nas amostras a serem analisadas. A linearidade do método foi medida pelo coeficiente de correlação linear da equação da curva analítica, sendo sempre superior a 0,99, conforme recomendado pela ANVISA (ANVISA, 2017). A sensibilidade do método foi definida pelo coeficiente angular da equação da reta e não possui um valor de referência recomendado pelos protocolos de validação.

#### 4.3.4 Precisão e exatidão

A precisão do método foi determinada por meio de estudos de repetibilidade e e reprodutibilidade dentro do laboratório de acordo com o recomendado pelo documento SANTE/11813/2017. Para avaliar a repetibilidade do método, foi empregada uma única laranja, da qual foi extraído o suco e fortificado com as concentrações do carbendazim em 2, 3,5 e 5 vezes o LOQ. As amostras foram então submetidas ao processo de extração DPX com o Si(PGPMS), mantendo todas as condições idênticas. Para a determinação da reprodutibilidade dentro do laboratório foram aplicadas as mesmas condições empregadas no estudo de repetibilidade, porém avaliando o RSD das extrações em três dias distintos. Durante o período, pode ocorrer algumas variações sejam nas etapas de extração, nas análises, nas amostras e também variações ambientais o que pode acabar acarretando na dispersão dos resultados, a dimensão dessa dispersão informa sobre a precisão do método, que é normalmente medida pelo desvio padrão relativo (RSD).

A exatidão representa a concordância de resultados de um determinado ensaio com um valor de referência aceito como verdadeiro. Uma das formas de avaliar a exatidão do método, definida no documento SANTE/11813/2017, é o ensaio de recuperação. Neste estudo, amostras de suco de laranja fortificadas com diferentes e conhecidas concentrações de carbendazim são submetidas ao processo de extração DPX com o sorvente preparado no laboratório e porcentagem de recuperação (da quantidade inicialmente adicionada de carbendazim) é calculada, definindo a exatidão do método.

Na Tabela 11 são apresentadas as estimativas do desvio padrão relativo e a taxa de recuperação do carbendazim, para a cada nível de concentração estudado e dia avaliado. Para este estudo foram realizadas 5 replicatas das medidas.

Tabela 11. Exatidão e precisão do método DPX na extração de resíduos de carbendazim de suco de laranja com detecção por CLAE-DAD.

[Carbendazim] ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Repetibilidade						Reprodutibilidade dentro do lab.	
	Dia 1		Dia 2		Dia 3			
	R (%)	RSD	R (%)	RSD	R (%)	RSD		
0,20	107,0	13,1	111,3	12,4	112,2	10,9	15,4	
0,35	106,2	3,3	98,0	7,0	100,8	7,7	11,6	
0,50	104,4	8,3	111,0	5,4	99,9	4,1	8,7	

Como pode ser observado na Tabela 11 o método proposto para determinação de carbendazim em suco de laranja apresentou taxas de recuperação do resíduo do agrotóxico na faixa de 98 a 112 %. Recuperações acima de 100 % são normalmente obtidas quando se determinam analitos em níveis residuais próximos ao limite de quantificação instrumental. Essa faixa de recuperações alcançada para o carbendazim indica que o método apresenta boa exatidão, uma vez que o critério de aceitação estabelecido no documento SANTE é de 70 a 120 % para resíduos de agrotóxicos em matrizes alimentícias. O método também pode ser considerado preciso, uma vez que os RSD independentes das concentrações e dias estudados ficaram abaixo de 16 % (Tabela 11). Uma dispersão dos resultados ligeiramente maior é obtida, como esperado, para a reprodutibilidade dentro de laboratório (precisão intermediária no protocolo recomendado pela ANVISA), obtida em diferentes dias do estudo. O critério de aceitação para a dispersão dos resultados na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos é de  $\text{RSD} < 20\%$  (SANTE, 2017).

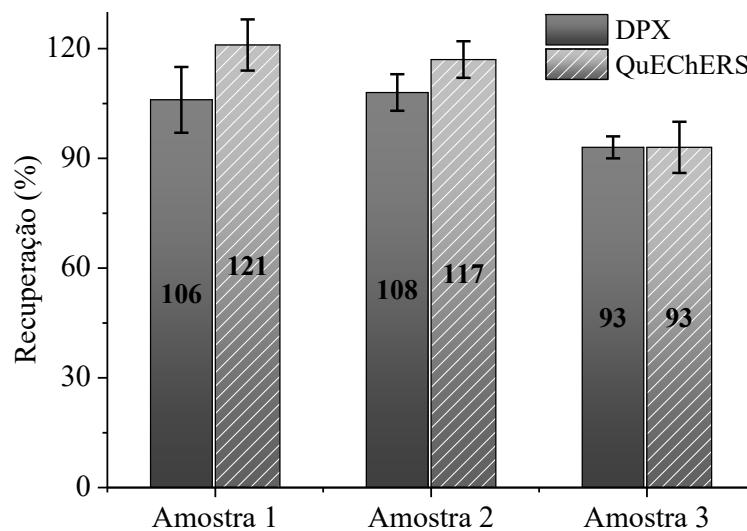
A exatidão e precisão obtidas para o método DPX neste trabalho podem ser consideradas, pelo menos similares, a outras relatadas na literatura para a determinação de

carbendazim em suco de laranja. Dreassi *et al.* (2010) empregaram a extração com solventes de carbendazim fortificado em amostras de suco de laranja, obtendo recuperações de 99,3 a 101,2 % com RSD entre 4,9 a 7,3 % para diferentes concentrações estudadas. Ferrer *et al.* (2011) empregando um método de injeção direta em sistema LC-MS/MS a partir da extração com solventes do carbendazim de suco de laranja obtiveram recuperações de 88,6 e 114,5 % em duas concentrações analisadas com RSD < 13,8 %. Bedendo, Jardim e Carasek (2012) empregando a microextração líquido-líquido com fibra oca fizeram um estudo da precisão e exatidão do método para determinação do carbendazim em suco de laranja, obtendo taxas de recuperação de 76 a 116 % com RSD de 6,9 e 11,0 % para a repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente. Rizzetti *et al.* (2016) empregando o método QuEChERS alcançaram taxas de recuperação de 77-99 % para o carbendazim em suco de laranja com RSD menor que 10 %. Akkbik e Hazer (2017) empregaram um método baseado na extração em fase sólida com um sorvente polimérico molecularmente impresso (MIP, *molecularly imprinted polymer*) a base de metilacrilamida para extrair carbendazim de suco de laranja, obtendo uma taxa de recuperação de 111,8 % com RSD de 5,2 %. Uma vantagem do método DPX proposto frente aos demais é sua combinação de uso de menores quantidades de solventes, sorventes e amostra e a simplicidade de execução da extração, levando a um processo rápido e de menor custo.

#### **4.4 Aplicação do método DPX a amostras comerciais de suco de laranja**

Após o estudo de otimização e validação do método DPX, três amostras comerciais de bebidas de laranja, de diferentes marcas, contendo 10 % de suco de laranja natural, foram adquiridas em supermercados locais e submetidas ao processo de extração empregando o sorvente Si(PGPMS). Nenhum dos extratos das amostras apresentou sinal no tempo de retenção do carbendazim no cromatograma, indicando que se houver resíduos de carbendazim nas amostras, estes se encontram abaixo do LOD do método. Desta forma, as amostras foram fortificadas com solução padrão de carbendazim com  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , limite máximo residual para o carbendazim em laranja no Codex Alimentarius (FAO, 2018), e foram submetidas ao método DPX proposto neste trabalho e também a um método baseado na extração QuEChERS (RIZZETTI *et al.*, 2016), empregando-o como referência para o estudo de exatidão por comparação de métodos. Os resultados de recuperação obtidos para ambos os métodos estão apresentados na Figura 16.

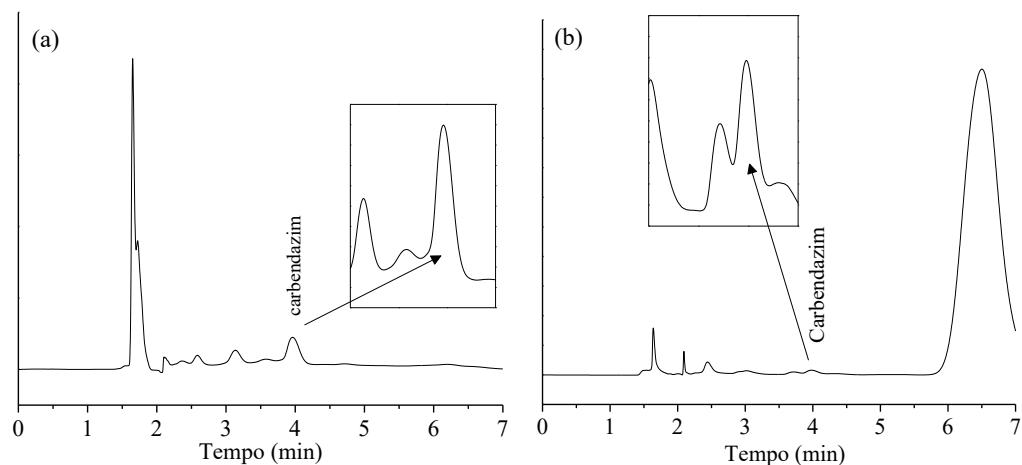
Figura 16. Recuperação de resíduos de carbendazim em amostras de suco de laranja fortificados no limite máximo residual estabelecido pela FAO, empregando os métodos DPX e QuEChERS. N = 3.



De acordo com a Figura 16, a recuperação do carbendazim pela técnica DPX apresentou resultados estatisticamente similares ao método QuEChERS, com recuperações dentro da faixa de recomendação, 70-120 % (SANTE, 2017). Os resultados indicaram também que não houve efeitos matriz na resposta, mesmo as bebidas comerciais serem constituídos de estabilizantes, edulcorantes, açúcares, conservantes, entre outros ingredientes adicionados ao produto. Destaca-se ainda que as extrações realizadas pelo método DPX além de mais simples, foram também mais rápidas, pelo menos três vezes, quando comparadas às realizadas pelo método QuEChERS.

Outro aspecto que pode ser ressaltado com relação ao método DPX com o sorvente Si(PGPMS) é a sua maior seletividade ao carbendazim frente aos componentes da matriz do suco de laranja, apresentando cromatogramas mais limpos que os obtidos para o carbendazim extraído pelo método QuEChERS, como pode ser observado na Figura 17.

Figura 17. Cromatogramas dos extratos de amostras comerciais de sucos de laranja, fortificadas com  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de solução padrão de carbendazim, obtidos pelos métodos (a) DPX com o sorvente Si(PGPMS) e (b) QuEChERS.



#### 4.5 Considerações finais

A Tabela 12 apresenta um resumo das principais características do método DPX empregando o sorvente Si(PGPMS) desenvolvido neste trabalho para a extração de resíduos de carbendazim de amostras de suco de laranja.

Tabela 12. Vantagens do método DPX empregando o sorvente Si(PGPMS) na extração de resíduos de carbendazim em suco de laranja.

<b>Vantagens da DPX Si(PGPMS)</b>	
Preparação do sorvente Si(PGPMS)	Simples, com uso de equipamentos simples e sem uso de reagentes químicos
Quantidade de amostra	1,5 mL de amostra
Massa do sorvente	0,2 g do sorvente
Volume do solvente	1,5 mL do solvente
Método DPX com o Si(PGPMS)	Poucas etapas para extração, sem a necessidade de etapa de limpeza
Processo de extração	Pode ser realizado em manifold a vácuo ou diretamente na micropipeta
Seletividade do Si(PGPMS)	Adequada, retém o carbendazim forte o suficiente e em apenas um ciclo de extração para removê-lo da matriz da amostra, porém permitindo a sua eluição com pequena alíquota de metanol acidificado na etapa seguinte

De uma forma geral, a preparação do sorvente Si(PGPMS) pode ser considerada simples e de fácil acesso, uma vez que se utiliza apenas de agitador magnético e estufa, refletindo também nos custos da preparação. Além disso, o controle das variáveis experimentais não é tão rigoroso quanto na preparação de materiais quimicamente ligados, ou seja, não requer ajuste rigoroso de temperatura ou solvente completamente anidro ou atmosfera inerte para evitar reações secundárias. A preparação do sistema DPX também é simples e fácil, pois o adsorvente é adicionado a seco dentro da ponteira, requerendo apenas a adição de um pequeno pedaço de algodão para reter as partículas do sorvente.

Com relação ao método DPX de extração de resíduos de carbendazim de amostras de suco de laranja, pode-se considerar que a quantidade de amostra empregada no processo de extração é relativamente pequena (1,5 mL), assim como a massa de sorvente (0,200 g) quando comparados a outros trabalhos disponíveis na literatura para extração de carbendazim de suco de laranja. O volume do solvente empregado para extração foi de 1,5 mL, apesar de não resultar em uma concentração do analito no extrato, o mesmo pode ser evaporado e re-suspendido em volumes menores para aumento do limite de quantificação do carbendazim no método otimizado. Em especial, as extrações DPX com o sorvente Si(PGPMS) podem ser realizadas em uma única etapa, um único ciclo de extração do carbendazim de suco de laranja, devido à boa seletividade do PGPMS para o agrotóxico.

## 5 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos pelas análises de MEV, área superficial e porosidade, análise termogravimétrica e espectroscopia de absorção na região do infravermelho pode-se concluir que as partículas de sílica foram modificadas significativamente com a incorporação de uma fina camada polimérica de PGPMS (cerca de 0,9 nm), com uma pequena redução da área superficial e de volume e diâmetro de poros em aproximadamente 50 %. O perfil da curva TG revela que a perda de massa que ocorre na faixa de temperatura de 326 a 450 °C é referente a degradação térmica do PGPMS, o que equivale a 6,8 % da massa total do sorvente, sugerindo que esta seja a massa de polímero imobilizada termicamente na superfície e poros da sílica. Os espectros de infravermelho do sorvente confirmaram a presença do PGPMS na superfície da sílica, uma vez que foram registrados sinais em 3050, 2940 e 2850  $\text{cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos C-H de grupos epóxi,  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , respectivamente, além do alargamento do sinal em torno de 1100  $\text{cm}^{-1}$  que pode ser atribuído à superposição dos sinais referentes ao estiramento C-O-C do polímero e Si-O-Si da estrutura do suporte. Logo, os sinais característicos do PGPMS foram devidamente registrados no material adsorvente, confirmando a obtenção do Si(PGPMS).

A aplicação do Si(PGPMS) como sorvente na ponteira descartável de micropipeta se apresentou efetiva para a extração de resíduos de carbendazim de amostras de suco de laranja. Após a otimização das condições de extração, o método DPX resultou em recuperações de carbendazim próximas a 100 %, não apresentando efeitos matriz significativos. O processo DPX para a extração empregando o sorvente Si(PGPMS) se apresentou como uma alternativa simples, de fácil execução, rápida e eficiente para a determinação de carbendazim em sucos de laranjas, sejam eles naturalmente obtidos da fruta ou envazados comercialmente. Quanto aos estudos de validação, empregando o protocolo estabelecido pela comunidade europeia para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos, o método desenvolvido neste trabalho se apresentou com boas exatidão e precisão, seletivo e com limites de detecção e quantificação inferiores ao limite máximo residual estabelecido para o carbendazim em laranjas pelo Codex Alimentarius. Dessa forma, o método DPX para extração de carbendazim de suco de laranja, empregando o sorvente Si(PGPMS), e quantificação dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos se apresenta como uma alternativa promissora para determinação rápida de carbendazim frente aos métodos disponíveis na literatura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKKBIK, M.; HAZER, O. Novel molecularly imprinted polymer for the determination of carbendazim from water and food by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Analytical Letters*, v. 51, p. 7-23, 2017. <https://doi.org/10.1080/00032719.2017.1284859>
- ALVES FILHO, J.P. Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos. São Paulo: Annablume; FAPESP, 2002. 188p.
- ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, v. 83, p. 412-431, 2003.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Relatório de Atividades de 2013 a 2015 do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. 2016. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br>. Acessado em Agosto de 2018.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166 de 24 de julho de 2017 que dispõe sobre a *Validação de métodos analíticos* e dá outras providências. Ministério da Saúde: Brasil, 2017.
- BARAHONA, F.; GJELSTAD, A.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K.E. Hollow fiber-liquid-phase microextraction of fungicides from orange juices. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 1989-1994, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.077>
- BEDENDO, G.C.; JARDIM, I.C.S.F.; CARASEK, E. Multiresidue determination of pesticides in industrial and fresh orange juice by hollow fiber microporous membrane liquid–liquid extraction and detection by liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry. *Talanta*, v. 88, p. 573-580, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.11.037>
- BOERIS, V.; ARANCIBIA, J.A.; OLIVIERI, A.C. Determination of five pesticides in juice, fruit and vegetable samples by means of liquid chromatography combined with multivariate curve resolution. *Analytica Chimica Acta*, v. 814, p. 23-30, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.01.034>
- BORDIN, D.C.M.; ALVES, M.N.R.; CAMPOS, E.G.; DE MARTINIS, B.S. Disposable pipette tips extraction: Fundamentals, applications and state of the art. *Journal of Separation Science*, v. 39, p. 1168-1172, 2016. <https://doi.org/10.1002/jssc.201500932>
- BRAIBANTE, M.E.F.; ZAPPE, J.A. A química dos agrotóxicos. *Química Nova na Escola*, v. 34, p. 10-15, 2012.
- BREWER, W.E. Disposable pipette extraction. *Patent US6566145B2*, 2003.
- CARVALHO, G.O.; SILVA, C.G.A.; FARIA, A.M. A New Stationary Phase for Analysis of Hydrophobic Compounds by RP-LC. *Chromatographia*, v. 79, p. 19-27, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10337-015-2993-9>
- CITRUSBR, Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos. Disponível em: <http://www.citrusbr.com>. Acessado em dezembro de 2018.
- COSTA, E.P. Degradação de carbendazim em água por foto-fenton solar em um fotorreator semipiloto do tipo RPR, 2017. 88 f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Saneamento,

Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017. <http://hdl.handle.net/1843/BUBD-AUAFYB>

COUTINHO, C.F.B.; GALLI, A.; MAZO, L.H.; MACHADO, S.A. Carbendazim e o meio ambiente: degradação e toxidez. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 16, p. 63-70, 2006. <http://dx.doi.org/10.5380/pes.v16i0.7480>

CURTI, S.M.M. Desenvolvimento de um método analítico para quantificação de resíduos de carbendazim em sucos de laranjas, 2014. 28f. Trabalho de conclusão (Graduação em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2014. <http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/5860>

DORFMAN, A.; FRANÇA, A.B.C.; DURAN, R.C. Barreiras comerciais, agências nacionais de saúde e o uso de agrotóxicos nos cítricos brasileiros. *Boletim Gaúcho de Geografia*, v. 40, p. 34-52, 2013. <https://doi.org/10.11606/t.11.2004.tde-20092004-165338>

DREASSI, E.; ZANFINI, A.; ZIZZARI, A.T.; LA ROSA, C.; BOTTA, M.; CORBINI, G. LC/Esi/Ms/Ms determination of postharvest fungicide residues in citrus juices. *LWT - Food Science and Technology*, v. 43, p. 1301-1306, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.04.010>

DUARTE, M.L.R. Cultivo da Pimenteira-do-reino na Região Norte. Boletim Técnico da Embrapa, Belém, PA, 2004.

FAO, Food and Agriculture Organization of United Nations. Codex Alimentarius International Food Standards. Disponível em [http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/commodities-detail/en/?lang=en&c\\_id=127](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/commodities-detail/en/?lang=en&c_id=127). Acessado em dezembro de 2018.

FARIA, A.M.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. State-of-the-art in immobilized polymer stationary phases for high-performance liquid chromatography. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, p. 1385-1398, 2009. <https://doi.org/10.1590/s0103-50532009000800002>

FDA, Food and Drug Administration. Disponível em <https://www.fda.gov/tc/includes/GetFile.ashx?mID=172&id=54271>. Acessado em novembro de 2018.

FERNANDES, A.R.; SOUZA, P.S.; OLIVEIRA, A.E.; CHAVES, A.R. A New Method for the Determination of Creatinine in Urine Samples Based on Disposable Pipette Extraction. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 29, p. 695-700, 2018. <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20170187>

FERNANDES, V.C.; DOMINGUES, V.F.; MATEUS, N.; DELERUE-MATOS, C. Comparison of Disposable Pipette Extraction and Dispersive Solid-Phase Extraction in the QuEChERS Method for Analysis of Pesticides in Strawberries. *Journal of Chromatographic Science*, v. 52, p. 1339-1345, 2014. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu003>

FERRER, C.; MARTÍNEZ-BUENO, M.J.; LOZANO, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Pesticide residue analysis of fruit juices by LC-MS/MS direct injection. One year pilot survey. *Talanta*, v. 83, p. 1552-1561, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.11.061>

GAMA, V.S. Otimização das condições de imobilização de poli(glicidoxipropilmethylsiloxano) sobre sílica no preparo de fase estacionária polar para CLAE, 2017. 50 f. Trabalho de conclusão (Graduação em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba, 2017. <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/20570>

GILBERT-LÓPEZ, B.; GARCÍA-REYES, J.F.; MEZCUA, M.; MOLINA-DÍAZ, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Determination of postharvest fungicides in fruit juices by solid-phase

extraction followed by liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 10548-10556, **2007**. <https://doi.org/10.1021/jf072272s>

GREGG, S.J.; SING, K.S.W. Adsorption, Surface Area and Porosity. London: Academic Press, **1982**, 303p.

GRUJIC, S.; RADISIC, M.; VASILJEVIC, T.; LAUSEVIC, M. Determination of carbendazim residues in fruit juices by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants*, v. 22, p. 1132-1137, **2005**. <https://doi.org/10.1080/02652030500352863>

GUAN, H.; BREWER, W.E.; GARRIS, S.T.; CRAFT, C.; MORGAN, S.L. Multiresidue Analysis of Pesticides in Fruits and Vegetables Using Disposable Pipette Extraction (DPX) and Micro-Luke Method. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 58, p. 5973-5981, **2010**. <https://doi.org/10.1021/jf903448w>

GUAN, H.; BREWER, W.E.; GARRIS, S.T.; MORGAN, S.L. Disposable pipette extraction for the analysis of pesticides in fruit and vegetables using gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 1867-1874, **2010**. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.047>

GUAN, H.; STEWART, K. Determination of explosives in water using disposable pipette extraction and high performance liquid chromatography. *Analytical Letters*, v. 47, 0. 1434-1447, **2014**. <https://doi.org/10.1080/00032719.2013.869826>

AGROLINK, disponível em [https://www.agrolink.com.br/noticias/ministerio-da-agricultura-recomenda-agrotoxicos-banidos\\_8591.html](https://www.agrolink.com.br/noticias/ministerio-da-agricultura-recomenda-agrotoxicos-banidos_8591.html). Acesso em fevereiro de **2019**.

ILKTAÇ, R.; AKSUNER, N.; HENDEN, E. Selective and sensitive fluorimetric determination of carbendazim in apple and orange after preconcentration with magnetite-molecularly imprinted polymer. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 174, p. 86-93, **2017**. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.11.029>

INNOCENZI, P.; FIGUS, C.; KIDCHOB, T.; VALENTINI, M.; ALONSO, B.; TAKAHASHI, M. Sol-gel reactions of 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane in a highly basic aqueous solution. *Dalton Transactions*, p. 9146-9152, **2009**. <https://doi.org/10.1039/b905830c>

IVANOFF, J.P.P. Avaliação da potencialidade de utilização do método Quechers na análise multirresíduo de agrotóxicos em hortigranjeiros, 2011. 37 f. Trabalho de Conclusão (Graduação em Química Industrial) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, **2011**. <http://hdl.handle.net/10183/37222>

JARDIM, I.C.S.F.; ANDRADE, J.A. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: Uma preocupação ambiental global – Um enfoque às maçãs. *Química Nova*, v. 32, p. 996-1012, **2009**. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000400031>

LEE, J.; WONG, H.; WANG, Y.; GARZA, M.; WEITMAN, S.D. Carbendazim: disposition, cellular permeability, metabolite identification, and pharmacokinetic comparison with its nanoparticle. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 92, p. 161-172, **2003**. <https://doi.org/10.1002/jps.10272>

LEHOTAY, S.J.; MASTOVSKA, K.; LIGHTFIELD, A.R.; NUNEZ, A.; DUTKO, T.; NG, C.; BLUHM, L. Rapid analysis of aminoglycoside antibiotics in bovine tissues using disposable pipette extraction and ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1313, p. 103-112, **2013**. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.103>

LI, Z.; LI, Y.; LIU, X.; LI, X.; ZHOU, L.; PAN, C. Multiresidue analysis of 58 pesticides in bean products by disposable pipet extraction (DPX) cleanup and gas chromatography–mass spectrometry determination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, p. 4788-4798, 2012. <https://doi.org/10.1021/jf300234d>

LIU, X.S.; TONG, Z.F.; ZHEN, L.; HUANG, D.X.; GAO, X.; XU, C.Y. Simultaneous analysis of thiabendazole, carbendazim and 2-aminobenzimidazole in concentrated fruit juices by liquid chromatography after a single mix-mode solid-phase extraction cleanup. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, v. 44, p. 591-597, 2009. <https://doi.org/10.1080/03601230903000636>

LOPES, N.P.; COLLINS, K.E.; JARDIM, I.C.S.F. Preparation of a polybutadiene stationary phase immobilized by gamma radiation for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 987, p. 77-85, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.09.029>

MACHADO, E.P. Relação entre taxas de mortalidade por câncer e a quantidade de agrotóxicos teoricamente usada no estado do Paraná, 2007, 138 f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007. <http://hdl.handle.net/1884/18478>

MAGALHÃES, V.G. Competência concorrente em matéria ambiental: proteção ao meio ambiente e justiça. *Revista Brasileira de Direito Constitucional*, v. 2, p. 139-163, 2003.

MALDANER, L.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. *Química Nova*, v. 33, p. 1559-1568, 2010. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422010000700024>

MALINOWSKI, C.E.; MALINOWSKI, M.O.S.O. O uso de agrotóxicos e a tutela penal da Lei nº 7802/89. *Direito e Direitos*, v. 1, p. 16, 2011

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/agrotoxicos>. Acessado em: dezembro de 2018.

MELO, L.F.; ARAÚJO, A.E. Agroecologia e nutrição no combate a produção e consumo de agrotóxicos e na promoção de hábitos alimentares mais saudáveis. *Revista Lugares de Educação*, v. 6, p. 125-138, 2016.

OENNING, A.L.; MERIB, J.; CARASEK, E. Na effective and high- throughput analytical methodology for pesticide screening in human urine by disposable pipette extraction and gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 1092, p. 459-465, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.047>

OLIVEIRA, J.S.; MARTINS, M.M.; APPELT, H.R. Trilogia: Química, sociedade e consumo. *Química Nova na Escola*, v. 32, p. 140-144, 2010.

PERES, F.; MOREIRA, J.C. (org.). *É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003. 384p. <https://doi.org/10.7476/9788575413173>

PERES, F.; MOREIRA, J.C.; DUBOIS, G.S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. *Scielo Books*, p. 21-41, 2003. <https://doi.org/10.7476/9788575413173>

PODHORNIAK, L.V. The use of dispersive pipet extraction (DPX) tips for the sample cleanup of apples, pears, and oranges in the analysis of formetanate HCl. *Journal of AOAC International*, v. 97, p. 942-945, 2014. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.13-092>

RADISIC, M.; GRUJIC, S.; VASILJEVIC, T.; LAUSEVIC, M. Determination of selected pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, v. 113, p. 712-719, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.103>

RAZZINO, C.A.; SGOBBI, L.F.; CANEVARI, T.C.; CANCINO, J.; MACHADO, S.A.S. Sensitive determination of carbendazim in orange juice by electrode modified with hybrid material. *Food Chemistry*, v. 170, p. 360-365, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.085>

RIZZETTI, T.M.; KEMMERICH, M.; MARTINS, M.L.; PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in orange juice by UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, v. 196, p. 25-33, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.010>

SANCHES, S.M.; SILVA, C.H.T.P.; CAMPOS, S.X.; VIEIRA, E.M. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, p. 53-38, 2003. <http://dx.doi.org/10.5380/pes.v13i0.3165>

SANGSTER, J. Octanol-water partition coefficients of simple organic compounds. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, v. 18, p.1111-1227, 1989.

<https://doi.org/10.1063/1.555833>

SANTE, Documento SANTE/11813/2017, Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. 2017. Disponível em: <http://www.eurl-pesticides.eu>, acessada em março de 2018.

SHARIF, Z.; MAN, Y.B.C.; HAMID, N.S.A.; KEAT, C.C. Determination of organochlorine and pyrethroid pesticides in fruit and vegetables using solid phase extraction clean-up cartridges. *Journal of Chromatography A*, v. 1127, p. 254-261, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.06.007>

SILVA, C.G.A.; COLLINS, C.H. Preparation and characterization of a poly(methyloctadecylsiloxane) thermally immobilized onto zirconized silica stationary phase for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1232, p. 248-256, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.073>

SILVA, J.M.; SILVA, E.N.; FARIA, H.P.; PINHEIRO, T.M.M. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 10, p. 891-903, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232005000400013>

SILVA, L.M. F.; DE ARAÚJO, G.T.; SILVA, D.V.; JUNIOR, M.V.; CARVALHO, C.M. Levantamento dos agrotóxicos utilizados na horticultura no município de Ubajara-CE. *Revista Brasileira de Agricultura Irrigada*, v. 5, p. 280-285, 2011. <https://doi.org/10.7127/rbai.v5n400063>

SILVA, R.C.; BARROS, K.A.; PAVÃO, A.C. Carcinogenicidade do carbendazim e seus metabólitos. *Química Nova*, v. 37, p. 1329-1334, 2014. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140214>

SPRINGER, V.; JACKSEN, J.; EK, P.; LISTA, A.G.; EMMER, A. Determination of fluoroquinolones in bovine milk samples using a pipette-tip SPE step based on multiwalled carbon nanotubes prior to CE separation. *Journal of Separation Science*, v. 37, p. 158-164, 2014.

<https://doi.org/10.1002/jssc.201300980>

XIONGFENG, H.; QUN, X.; ROHRER, J. Determination of carbendazim in orange juice. Thermo Scientific Application Note 1067: AN70748\_E 07/16S. Sunnyvale, CA, 2013.

YOUNG, M.S.; PHILLIPS, D.J.; IRANETA, P.C.; KROL, J. Mixed-mode solid-phase extraction and cleanup procedures for the liquid chromatographic determination of thiabendazole and carbendazim in fruit juices. *Journal of AOAC International*, v. 84, p. 556-561, 2001.