



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: Licenciatura Noturno



CINTHIA MILENA OTAVIANO

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA EXTRAÇÃO
DO INSETICIDA FIPRONIL EM CASCAS DE OVOS**

ITUIUTABA/MG

2022

CINTHIA MILENA OTAVIANO

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DO
INSETICIDA FIPRONIL EM CASCAS DE OVOS**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada à
Comissão Avaliadora como parte das exigências do
Curso de Graduação em Química: Licenciatura –
Noturno do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do
Pontal da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientador: Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria

ITUIUTABA/MG

2022

CINTHIA MILENA OTAVIANO

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DO
INSETICIDA FIPRONIL EM CASCAS DE OVOS**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada à Comissão Avaliadora como parte das exigências do Curso de Graduação em Química: Licenciatura – Noturno do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal da Universidade Federal de Uberlândia.

Ituiutaba, 02 de Abril de 2022

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Regina Massako Takeuchi

MSc. Marcos Vinícius Ferreira

Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Girlene e Geraldo, a minha irmã Cecília, a minha avó Aydê, ao Dr. Anizio Marcio de Faria e aos meus amigos por todo o carinho e incentivo que me ajudaram a evoluir e realizar o meu sonho.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por tornar tudo isso possível.

À minha avó Aydê por ter sido minha fortaleza e minha inspiração e, de onde estiver, tenho certeza de que estará orgulhosa de mim agora.

Aos meus pais, que também tornaram esse sonho possível, que me incentivaram sempre a lutar pelo que quero e que mesmo à distância, sempre estiveram presentes. Gratidão a eles, pela pessoa que luto para me tornar.

À minha irmã Cecília, que me apoiou em minhas decisões, me encorajou a estar aqui e sempre esteve à disposição para tudo que eu precisasse.

Ao meu querido primo Rodrigo, que durante o tempo que estive entre nós foi o alicerce de minha família enquanto estive fora, foi também o carinho, a união e a nossa força.

Ao professor orientador Dr. Anizio Marcio de Faria, por ter aceitado me orientar, por ter me dado a oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa CroMat, pela sua paciência, pela sua orientação sempre assertiva e sublime, por todos os conhecimentos compartilhados e toda ajuda que tornou possível a conclusão deste trabalho.

Ao Allyson, por ser um excelente amigo, por me apoiar sempre e me ajudar muito com minha iniciação científica.

Aos professores do curso de química, por todo o conhecimento compartilhado e por serem minhas inspirações.

Agradeço também aos amigos que fiz na Universidade, cada um deixou seu marco em meu coração.

EPÍGRAFE

*“Educação não transforma o mundo.
Educação muda as pessoas.
Pessoas mudam o mundo.”*

(Paulo Freire)

RESUMO

O uso intenso de fipronil ao longo de todo Brasil e em especial em regiões próximas às áreas de desova de tartarugas de água doce pode representar uma ameaça considerável à reprodução desses organismos. Cascas de ovos de tartaruga podem ser usadas como biomarcadores para indicar a contaminação de espécies nativas que vivem próximas a áreas de cultivo. Assim, o desenvolvimento de um método para determinar fipronil em cascas de ovos é premente e constitui o principal objetivo do presente estudo. O método proposto foi baseado na extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura por ser um método simples e de pouca interferência do analista. As condições de extração deste método foram otimizadas usando um planejamento estatístico baseado na matriz Doehlert. A massa da casca do ovo, o volume de extração do solvente e o tempo de congelamento foram os parâmetros otimizados do método pela ferramenta estatística, gerando recuperações de fipronil próximas a 100 % sem a necessidade de uma etapa de limpeza. Os volumes de solvente e massas de amostras otimizados são relativamente menores que os métodos de extração sólido líquido com partição em baixa temperatura já desenvolvidos. O método proposto foi preciso e robusto, mantendo desvios padrão relativos abaixo de 7,5 % durante todo o estudo de otimização e validação. Além disso, o método otimizado foi linear, robusto, preciso e exato na faixa de concentração de fipronil de 5,0-500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. O limite de quantificação para fipronil foi de 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, cerca de 2,5 vezes menor que o limite máximo residual para fipronil em ovos. Assim, o método SLE-LTP realizado em etapa única apresentou um forte potencial para ser empregado no monitoramento de resíduos de fipronil em cascas de ovos de tartarugas de água doce.

Palavras-chave: Cascas de ovos, CLAE-DAD, fipronil, otimização, validação.

ABSTRACT

The intense use of fipronil throughout Brazil and especially in regions close to the spawning areas of freshwater turtles may pose a considerable threat to the reproduction of these organisms. Turtle eggshells can be used as biomarkers to indicate the contamination of native species around cultivation areas. So, the development of a method to determine fipronil residues in eggshells is the main objective of this study. The proposed method was based on solid-liquid extraction with low-temperature partitioning, as it is a simple method with little interference from the analyte. The extraction conditions of this method are optimized using a statistical design based on the Doehlert Matrix. Eggshell sample mass, solvent volume, and freezing time were the parameters optimized for the method by the statistical tool, generating fipronil recoveries close to 100% without the need for a clean-up step. Optimized solvent volumes and sample masses were relatively smaller than previously developed low-temperature partitioned solid-liquid extraction methods. The proposed method was precise and robust, keeping relative standard deviations smaller than 7.5 % in the optimization and validation studies. Furthermore, the optimized method was linear in the fipronil concentration range of 5.0-500.0 $\mu\text{g L}^{-1}$. The limit of quantification for fipronil was 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. This value is about 2 times lower than the maximum residual limit for fipronil in eggs. The SLE-LTP method was performed in a single step and presented a potential to be used for the evaluation of fipronil residues in freshwater turtle eggshells.

Keywords: Eggshells, HPLC-DAD, fipronil, optimization, validation.

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Análise de variância)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DAD	Detector de arranjo de diodos
GABA	<i>Gamma-aminobutyric acid</i> (ácido gama-aminobutírico)
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta eficiência)
IDA	Ingestão Diária Aceitável
LD	<i>Lethal dose</i> (dosagem letal)
LLE	<i>Liquid-liquid extraction</i> (extração líquido-líquido)
LOQ	<i>Limit of quantification</i> (Limite de quantificação)
MP	<i>Mobile phase</i> (Fase móvel)
MRL	<i>Maximum residue limit</i> (Limite Máximo de Resíduos)
MSPD	<i>Matrix solid-phase dispersion</i> (dispersão da matriz em fase sólida)
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
RSD	<i>Relative standard deviation</i> (desvio padrão relativo)
SLE-LTP	<i>Solid-liquid extraction with low-temperature partitioning</i> (Extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura)
SPE	<i>Solid-phase extraction</i> (extração em fase sólida)
SPME	<i>Solid-phase microextraction</i> (microextração em fase sólida)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos Agrotóxicos de acordo com sua toxicidade. _____	14
Tabela 2 – Condições avaliadas para otimização da SLE/LTP de fipronil de casca de ovos. _____	23
Tabela 3 – Matriz Doehlert de experimentos para otimização da SLE-LTP de fipronil em casca de ovos. _	24
Tabela 4 – Variáveis e níveis estudados para avaliação da robustez pelo teste de Youden. _____	27
Tabela 5 – Combinação fatorial de parâmetros analíticos para avaliação da robustez do método de determinação de fipronil em cascas de ovos pelo teste de Youden. _____	27
Tabela 6 – Porcentagem de recuperação do fipronil de cascas de ovos pelo método SLE-LTP na otimização empregando a matriz Doehlert. _____	32
Tabela 7 – Coeficientes estimados para o modelo quadrático obtido do planejamento experimental com a matriz Doehlert e suas significâncias estatísticas ao nível de 95% de probabilidade. _____	33
Tabela 8 – Análise de variância do modelo quadrático para otimização da extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura de fipronil de casca de ovos. _____	34
Tabela 9 – Parâmetros analíticos das curvas de calibração do fipronil obtidas pelos métodos do padrão externo (preparada em solvente) e da calibração na matriz (preparada no extrato do branco). _____	38
Tabela 10 – Porcentagens de recuperação do fipronil em cascas de ovos, empregando o método SLE-LTP.	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tartaruga da Amazônia (<i>Podocnemis expansa</i>). _____	15
Figura 2 – Forma estrutural do Fipronil. _____	17
Figura 3 – Porcentagens de recuperação do fipronil de cascas de ovos, empregando diferentes solventes extratores pelo método SLE-LTP. _____	29
Figura 4 – Cromatograma dos extratos de cascas de ovos obtidos pelo método SLE-LTP e analisado por HPLC-DAD nos comprimentos: (A) 210 nm e (B) 230 e 280 nm. (C) Espectro de absorção no UV para o pico do fipronil analisado em 5,6 min no HPLC. Condições de análise: fase móvel MeOH:H ₂ O(70:30, v/v), vazão 1,2 mL min ⁻¹ e temperatura de 30 °C. _____	31
Figura 5 – Superfícies de respostas para a extração de fipronil de cascas de ovos de acordo com o modelo quadrático ajustado para otimização do método SLE-LTP. _____	35
Figura 6 – Cromatograma das soluções de fipronil preparadas em solvente, no extrato e no branco da SLE-LTP de amostras de cascas de ovos. Condições: MeOH:H ₂ O(70:30, v/v), vazão 1,2 mL min ⁻¹ , temperatura 30 °C e detecção DAD a 230 nm. _____	36
Figura 7 – Curvas analíticas do fipronil obtidas pelo método do padrão externo e pelo método da calibração na matriz. _____	38
Figura 8 – Avaliação da robustez do método SLE-LTP a partir da variação deliberada dos níveis de sete variáveis, conforme sugerido por YOUNG e STEINER (1975). _____	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Agrotóxicos	13
1.1.1 Toxicidade dos agrotóxicos	13
1.1.2 Contaminação durante a aplicação dos agrotóxicos	14
1.1.3 Exposição da tartaruga da Amazônia a agrotóxicos	15
1.1.4 Fipronil	16
1.2 Métodos de extração de agrotóxicos	18
2 OBJETIVOS	20
3 METODOLOGIA	21
3.1 Reagentes, solventes e materiais	21
3.2 Preparação das amostras de ovos	21
3.3 Preparação das soluções padrão de fipronil	21
3.4 Fortificação das cascas de ovos	22
3.5 Otimização da SLE-LTP de fipronil de cascas de ovos	22
3.5.1 Avaliação do solvente extrator	22
3.5.2 Planejamento experimental para otimização da SLE-LTP	22
3.6 Análise cromatográfica dos extratos	24
3.7 Validação do método de determinação de fipronil em cascas de ovos	24
3.7.1 Seletividade	25
3.7.2 Limite de quantificação do método	25
3.7.3 Faixa dinâmica linear	25
3.7.4 Efeito matriz	25
3.7.5 Exatidão e precisão	26
3.7.6 Robustez	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Otimização da extração de fipronil de cascas de ovos	29
4.1.1 Avaliação do solvente extrator	29
4.1.2 Aplicação da matriz Doehlert na otimização da SLE-LTP de fipronil de cascas de ovos	32
4.2 Validação do método de determinação de fipronil em cascas de ovos	36
4.2.1 Avaliação do solvente extrator	36
4.2.2 Limite de quantificação	37
4.2.3 Faixa dinâmica linear	37
4.2.4 Efeito matriz	39

4.2.5 <i>Exatidão e precisão do método</i>	39
4.2.6 <i>Estudo da robustez do método</i>	41
5 CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 Agrotóxicos

Os agrotóxicos são muito usados para prevenir, combater e controlar pragas, podendo ser aplicados em florestas, ambientes aquáticos, urbanos, industriais e, principalmente, na agricultura e pecuária. Considerando sua finalidade, os agrotóxicos podem ser classificados como: inseticidas, fungicidas, herbicidas, fumigantes, raticidas, moluscocidas, acaricidas e nematocidas (SILVA; FAY, 2004).

No período de 2000 a 2010, o mercado brasileiro de agrotóxicos cresceu 190 %, sendo mais que o dobro do mercado mundial (que cresceu cerca de 93 %), lembrando que o modelo de agricultura tropical desenvolvido atualmente no país está cada vez mais dependente do controle químico realizado com os agrotóxicos (ROSSI, 2015). Segundo o boletim anual de 2020 do Ministério da Agricultura, foi aprovado o registro no Brasil de 493 agrotóxicos somente no ano de 2020, que anteriormente não eram certificados, sendo esse o maior volume já documentado pelo mesmo (BROCHARDT; LONDRES, 2021).

Segundo Oliveira *et al.* (2014) com a intenção de combater os insetos e as plantas invasoras da lavoura, o homem acaba contaminando, não só o ambiente agrícola, mas também, os ecossistemas naturais. Além de atingir as lavouras, a névoa de agrotóxicos polui o ar, o solo, a água, os moradores, os animais e as plantas que estão nas áreas próximas ou, até mesmo, distantes do local de aplicação (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Devido aos diferentes princípios ativos encontrados nos agrotóxicos faz-se necessário um controle rigoroso na aplicação devido à toxicidade dos agrotóxicos, visto que a ação pode não ser apenas no organismo alvo, mas podendo ocorrer também em ambientes e espécies considerados não-alvo.

1.1.1 Toxicidade dos agrotóxicos

Os agrotóxicos são classificados quanto ao seu grau de risco, que vai da classe I até a classe IV, sendo que os da classe I são os mais tóxicos e os da classe IV os menos tóxicos. Essa classificação é baseada em ensaios feitos em laboratórios que estabelecem a dosagem letal do agrotóxico como sendo a concentração em que a letalidade atinge 50 % dos indivíduos testados (DL₅₀) (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009). Para facilitar o reconhecimento do grau de toxicidade de um agrotóxico, utiliza-se uma escala de cores, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação dos Agrotóxicos de acordo com sua toxicidade.

Classe	Grau de Toxicidade	LD ₅₀	Cor da faixa
I	Extremamente tóxico	≤ 5 mg kg ⁻¹	Vermelha
II	Altamente tóxico	Entre 5 e 50 mg kg ⁻¹	Amarela
III	Medianamente tóxico	Entre 50 e 500 mg kg ⁻¹	Azul
IV	Pouco tóxico	Entre 500 e 5000 mg kg ⁻¹	Verde

Fonte: (PERES; MOREIRA, 2003).

A dosagem letal é obtida pela quantidade em miligramas do agrotóxico pela massa do corpo do indivíduo em quilogramas (mg kg⁻¹). A capacidade da substância de causar danos depende da sua toxicidade e da quantidade absorvida pelo corpo. Logo, quanto mais tóxico o agrotóxico, menor a quantidade dele será suficiente para causar danos e perigo à saúde do indivíduo, ou até mesmo ao meio ambiente (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

1.1.2 Contaminação durante a aplicação dos agrotóxicos

Com o uso generalizado dos agrotóxicos nas mais diferentes culturas, grandes transtornos e modificações estão ocorrendo no meio ambiente, tanto pela contaminação de comunidades de seres vivos, como pela acumulação nos segmentos bióticos e abióticos do ecossistema. Um efeito indesejável provocado pela sua utilização é a contaminação de espécies não-alvo, ou seja, que não interferem no processo de produção (RIBAS; MATSUMURA, 2009).

Na aplicação de agrotóxicos nas lavouras, cerca de 99 % dos produtos ministrados não são absorvidos pelas plantas, se dispersando pelo ambiente e infiltrando-se no solo e nas águas subterrâneas, contaminando direta ou indiretamente organismos não-alvo (ZHANG *et al.*, 2011; CASTRO LIMA *et al.*, 2020).

A contaminação ambiental proveniente do uso indiscriminado de agrotóxicos na agricultura acaba por desencadear uma série de prejuízos ao ambiente, comprometendo a qualidade e integridade da biodiversidade e ameaçando a sobrevivência dos ecossistemas (SPADOTTO, 2006). Estes compostos têm toxicidade variável e depende das propriedades dos ingredientes ativos e inertes do produto, o que determina os efeitos de contaminação aguda, subcrônica e crônica que podem interferir na fisiologia, no comportamento e na reprodução dos organismos (SPADOTTO, 2006; BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

A forma considerada mais simples de aplicação de agrotóxicos é a pulverização manual. Com o auxílio de um pulverizador manual os agricultores aplicam o agrotóxico no local a ser tratado

(PORTO; SOARES, 2012). Uma outra forma de aplicação de agrotóxicos é a pulverização aérea, em que o agrotóxico é levado pelas correntes aéreas a locais diferentes de onde são aplicados originalmente, podendo assim contaminar o solo, a água, e até as comunidades aos arredores (PERES; MOREIRA, 2003). Essa forma de aplicação é feita principalmente através de aeronaves e é utilizada, na maioria das vezes, pelos fazendeiros que possuem grandes áreas de cultivo, as quais a pulverização manual seria inviável (PORTO; SOARES, 2012).

A inviabilidade de se realizar a pulverização manual, faz com que o risco de contaminação seja elevado, já que não há um controle preciso do local de aplicação do agrotóxico. Uma vez em contato com as correntes aéreas há uma dispersão desses agrotóxicos por uma extensa área territorial, alvo e não-alvo. Essa falta de controle afeta ecossistemas nos quais promovem a vida e reprodução de animais. Um dos animais que pode estar sendo afetado com o uso indiscriminado de agrotóxicos são as tartarugas da Amazônia (*Podocnemis expansa*).

1.1.3 Exposição da tartaruga da Amazônia a agrotóxicos

Conhecida popularmente como tartaruga da Amazônia, a *Podocnemis expansa*, Figura 1, é um quelônio de água doce considerada a maior espécie do gênero *Podocnemis*, amplamente distribuída nas bacias dos rios Amazonas e Tocantins-Araguaia no Brasil, Orinoco na Venezuela e Essequibo na Guiana. A tartaruga da Amazônia é da ordem dos Testudines e da família das Podocnemididae (VOGT *et al.*, 2015). A espécie está dispersa por uma grande área ao norte do continente sul-americano, principalmente em regiões amazônicas (IVERSON, 1992) e tem o hábito de procurar alimentos em florestas alagadas durante as cheias e visitar praias arenosas para nidificar na vazante (FORERO-MEDINA *et al.*, 2019).

Figura 1 – Tartaruga da Amazônia (Podocnemis expansa).



Fonte: VOGT *et al.* (2022).

A desova de *Podocnemis expansa* é controlada pelos níveis de água, com período variando conforme a localidade. Normalmente, ocorre entre julho e agosto no Acre, no rio Araguaia entre agosto e outubro, em setembro ocorre em Rondônia, Goiás e Tocantins, entre setembro e outubro ocorre no Amapá e Mato Grosso, em outubro nos rios Xingu e Tapajós, e entre dezembro e janeiro ocorre em Roraima (BATISTELLA; VOGT, 2008). A *Podocnemis expansa* deposita em média 100 ovos por ninhada (RUEDA-ALMONACID *et al.*, 2007). Os ovos podem ser alongados ou esféricos, as cascas podem ser rígidas e ásperas com um pequeno potencial de trocas hídricas e gasosas com o meio; ou flexíveis sendo dependentes do ambiente hídrico com uma camada calcária porosa (EWERT, 1979). Os ovos são depositados em diversos ambientes, sendo alguns deles: praias fluviais, costeiras, solo barroso, arenoso-argiloso e em meio a vegetação.

Muitas são as propriedades que podem ser observadas quando é feita uma análise química da composição das cascas de ovos, desde histórico ambiental de contaminação até a disfunção fisiológica das fêmeas. As cascas de ovos são muito utilizadas como indicadores nas investigações dos efeitos das substâncias lançadas no ambiente que acabam provocando um efeito deletério em ovíparos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

As cascas dos ovos de tartaruga consistem em duas partes: uma membrana fibrosa e uma camada calcária ligada a superfície externa da membrana. O componente calcário das cascas de ovos da espécie *Podocnemis expansa* é o carbonato de cálcio em uma das suas formas cristalinas, conhecido também como aragonita (PACKARD, 1991).

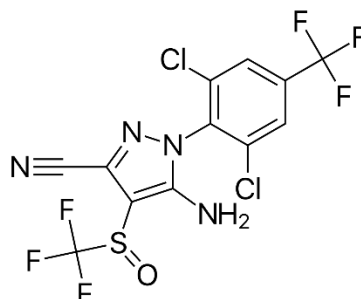
Estudos já relataram alguns efeitos tóxicos da exposição à agrotóxicos em *Podocnemis expansa*, como: a redução na taxa de eclosão e nos níveis de fósforo e gordura total da casca de ovos expostos a parationa-metílica (VALDES *et al.*, 2015), redução do número dos ossículos esclerais (anéis ósseos encontrados nos olhos de vários grupos de animais vertebrados) e a aparição de ossículos rudimentares e lacunas em embriões de *Podocnemis expansa* submetidos a atrazina (CARNEIRO *et al.*, 2021) e mudanças na morfometria eritrocitária (arsenal de medições e análises matemáticas da configuração da superfície eritrocitária, formas e dimensões) em tartarugas juvenis sujeitas à diferentes concentrações de glifosato, atrazina e fipronil (OLIVEIRA *et al.* 2020). Ainda assim, são escassas as informações sobre os reais impactos biológicos provenientes da exposição dos agrotóxicos isolados na saúde dessa espécie e no meio ambiente em que habitam.

1.1.4 Fipronil

O fipronil, [5-amino-1-(2,6-dicloro-R, R, -trifluoropril) -4- (trifluorometil) sulfinil] pirazole-3-carbonitrilo], apresentado na Figura 2, é considerado um inseticida altamente ativo e de um amplo

espectro, pois é utilizado em mais de 100 diferentes cultivos agrícolas, além de ser empregado em tratamentos veterinários e dedetização urbana, rural e domissanitária (REIGART; ROBERTS, 2013; CHAULET *et al.*, 2019).

Figura 2 - Forma estrutural do Fipronil.



Derivado da família do fenilpirazol, o fipronil tem como principal função o rompimento do sistema nervoso central dos insetos, por meio do bloqueio dos canais de cloro mediados pelos aceptores do ácido gama-aminobutírico (GABA, *gamma-aminobutyric acid*), promovendo paralisias, convulsões e até a morte (TINGLE *et al.*, 2003; CHAULET *et al.*, 2019). Por possuir caráter hidrofóbico, LogP 4,0 (PUBCHEM, 2021), a sua molécula apresenta um baixo potencial de lixiviação e forte potencial de adsorção no solo, apresentando maior afinidade por matrizes orgânicas como: os lipídeos, os óleos e os solventes orgânicos (GUNASEKARA *et al.*, 2007).

Alguns dos cultivos agrícolas que empregam o fipronil são: arroz, amendoim, algodão, batata, cana-de-açúcar, cevada, feijão, girassol, eucalipto, milho, soja e trigo, cujas modalidades de aplicação variam entre sementes, solo e foliar (GUEDES, 2019).

A utilização do fipronil em grandes quantidades pode gerar resíduos no ambiente, essencialmente nos recursos hídricos próximos às áreas nas quais foi utilizado (CHAULET *et al.*, 2019). Sua degradação é considerada lenta no solo e na água, com uma meia-vida variando entre 36 horas a quase 8 meses, dependendo do substrato e condições do ambiente (SCORZA JUNIOR; FRANCO, 2013).

No Brasil, o fipronil é um dos inseticidas mais utilizados na agricultura para controle e extermínio de insetos (SIMON-DELSO *et al.*, 2015). O fipronil é comercialmente encontrado como Icon, Ascend, Chipco, Adonis, Frontline e Regent e é também classificado como classe II - moderadamente perigoso pela Organização Mundial da Saúde e altamente tóxico (faixa amarela) pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (WHO, 2010; CHAGURI, 2016; ANVISA, 2019).

Apesar da toxicidade desconhecida para organismos não-alvo, há evidências suficientes de que o fipronil apresenta sérios riscos para os mesmos (CASTILHOS *et al.*, 2019; BONMATIN *et al.*,

2015; TU *et al.*, 2019). Além disso, em 2017, na Holanda, foi registrado um grave incidente de contaminação em ovos de galinha tratados com fipronil para eliminar o ácaro vermelho (NAYAK *et al.*, 2022; EC, 2017). Os níveis de fipronil detectados chegaram a $720 \mu\text{g kg}^{-1}$ em ovos e $770 \mu\text{g kg}^{-1}$ na carne de frango (TU *et al.*, 2019; EC, 2017). Esses resultados indicaram que as moléculas de fipronil são estáveis e se movem para ambientes de maior afinidade, como para o interior dos ovos. Os limites máximos permitidos de fipronil em alimentos, tais como carne e ovos é de $20,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ (FAO, 2019)

Diante dessas circunstâncias, a avaliação do fipronil em cascas de ovos de tartarugas pode ser um indicador de monitoramento de risco para espécies em habitat com monoculturas em suas mediações, como tem ocorrido na bacia do Tocantins-Araguaia, onde vivem as tartarugas da Amazônia.

1.2 Métodos de extração de agrotóxicos

O monitoramento dos resíduos de agrotóxicos se faz por meio da extração destes compostos das cascas de ovos, associada à análise química posterior por uma técnica instrumental. Devido a ausência de métodos para determinação de fipronil em cascas de ovos, até onde conhecemos, é de grande importância desenvolver um método analítico que possa viabilizar o monitoramento dos resíduos do inseticida e avaliar o risco de contaminação de espécies que passaram a compartilhar o seu habitat com as monoculturas.

Diversos métodos de preparação de amostra aplicados para a extração de resíduos de agrotóxicos de diferentes tipos de amostras são descritos na literatura. Métodos como a microextração em fase sólida (*solid-phase microextraction* – SPME) (LI; ROW, 2018; SILVA; PAWLISZYN, 2015); extração em fase sólida (*solid-phase extraction* – SPE) (ARES, *et al.*, 2017; PELAJIC, *et al.*, 2016); extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction* – LLE) (AKRAM, MUSHTAQ, 2018; GIROUD, *et al.*, 2019); dispersão da matriz em fase sólida (*Matrix Solid-Phase Dispersion* – MSPD) (BARRETO, *et al.*, 2018; FREITAS; SERAFIM; LANÇAS, 2018); QuEChERS (Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) (ANASTASSIADES, *et al.*, 2003; PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011); extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura (*solid-liquid extraction with low-temperature partitioning* - SLE-LTP) (SANTANA; SOARES; FARIA, 2018; RODRIGUES, *et al.*, 2018), entre outros.

A extração sólido-líquido e/ou líquido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE-LTP ou LLE-LTP, *liquid-liquid extraction with low-temperature partitioning*) tem se apresentado como uma alternativa interessante para extração de agrotóxicos, por ser uma técnica simples, que não exige

instrumentação sofisticada, com poucas etapas e de fácil execução, empregando baixos volumes de solvente orgânico (os volumes de solvente otimizados são relativamente menores que os métodos de extração sólido líquido com partição em baixa temperatura já desenvolvidos), menos tóxicos que as extrações com solventes tradicionais (GOULART *et al.*, 2010). O método é baseado na partição dos analitos entre as fases aquosa e orgânica miscíveis entre si, obtida a partir do abaixamento da temperatura (de -4 a -20 °C). A vantagem deste método é que a maior parte dos componentes da amostra são congelados com a fase aquosa, enquanto os resíduos de agrotóxicos são extraídos juntamente com o restante da matriz para a fase orgânica (SILVÉRIO *et al.*, 2012), que permanecem em estado líquido podendo ser coletados e analisados por um método de separação e quantificado, gerando em média bons resultados percentuais de recuperação (GOULART *et al.*, 2010).

O método SLE-LTP se mostrou eficiente na extração e na análise de agrotóxicos em tomate, batata, morango, abobrinha, alface e diversos outros alimentos. Sobretudo, o método SLE-LTP já foi empregado na extração de agrotóxicos organoclorados e bifenilas policloradas em ovos de jacaré caiman do Pantanal brasileiro, se mostrando eficiente na extração de compostos em matrizes desta natureza (SOUSA *et al.*, 2014). Além disso, o método já foi empregado no Laboratório de Pesquisas em Materiais de Separação e Cromatografia (CroMat) para a determinação de resíduos de agrotóxicos na polpa de cajá-manga e pequi, obtendo taxas de recuperação próximas a 100 % com boa precisão (SANTANA; SOARES; FARIA, 2018; FERREIRA, 2019). A motivação para escolha do SLE-LTP para a condução deste trabalho foi baseada na necessidade de menor número de etapas experimentais, menor interferência do analista e menor volume de solventes extrator para sua execução, o que resulta em menor volume de resíduos da extração e a torna um método de preparação de amostra mais simples e de baixo custo. Assim, no presente trabalho, focamos no desenvolvimento e validação de um método para quantificar o fipronil em cascas de ovos, usando as cascas de ovos de galinha como organismo modelo para possibilitar a aplicação posterior na determinação de fipronil em cascas de ovos de *Podocnemis expansa*.

2 OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi desenvolver, otimizar e validar um método analítico de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE-LTP) de resíduos de fipronil em casca de ovos, empregando análises por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD, *high-performance liquid chromatography with diode array detection*).

Para alcançar o objetivo principal desta proposta, as seguintes etapas foram realizadas:

- ✓ Desenvolver um método de extração sólido-líquido com partição à baixa temperatura para extração de fipronil em cascas de ovos de galinha, como organismo modelo;
- ✓ Otimizar o método SLE-LTP empregando planejamento estatístico baseado na matriz Doehlert;
- ✓ Validar o método de acordo com o guia de validação de métodos analíticos proposto pela Comunidade Europeia, documento SANTE/12682/2019 (SANTE, 2020);

3 METODOLOGIA

3.1 Reagentes, solventes e materiais

Para o desenvolvimento e otimização do método de extração foram utilizados Fipronil (Sigma-Aldrich, 97% Pestanal[®]), balança analítica de 0,0001 g (Acculab, Bradford, PA, EUA), Eppendorf de 5,0 mL, pipetas graduadas de 5,0 mL e 10,0 mL, micropipetas (0,5 – 10 μ L, 10 – 100 μ L e 100 – 1000 μ L), agitador vórtex (ARSEC modelo TS200, São Paulo, Brasil), centrífuga (Celm, modelo combate, São Caetano do Sul, Brasil), água ultrapurificada com resistividade maior que 18,9 M Ω cm em purificador MegaPurity e freezer Consul modelo Bem Estar CRM55, para a partição em baixa temperatura. Para o preparo da fase móvel foram utilizadas membranas de Nylon[®] (Millipore[®], Millford, CT, EUA) para filtração com porosidade de 0,22 μ m e diâmetro de 45 mm; sistema de filtração de fase móvel; funil de placa sinterizada; bomba de vácuo; kitassato de 500 mL, e; banho ultrassom (Quimis, Diadema, Brasil). O reagente utilizado para o preparo da fase móvel foi o metanol, grau cromatográfico com 99,5% (J. T. Baker, São Paulo, Brasil). Para as análises foi utilizado um cromatógrafo a Líquido Waters modelo Alliance e2695, com sistema de detecção de arranjo de diodos modelo 2998 PDA, gerenciado pelo software Empower3[®].

3.2 Preparação das amostras de ovos

Cascas de ovos de galinha, mantendo sua membrana interna que é constituída de colágeno tipo I, elastina, desmosina, isodesmosina e glicosaminoglicanos, foram devidamente lavadas com água destilada aquecida a 50 °C e secas a 80 °C por 4 h em estufa. As cascas secas foram maceradas com pistilo e gral de porcelana até a obtenção de um pó finamente dividido. Em seguida, o sólido macerado foi peneirado manualmente em peneiras com granulometria entre 400 e 270 mesh e reservado em frascos até o momento do uso.

3.3 Preparação das soluções padrão de fipronil

Considerando a solubilidade do fipronil em metanol de 137,5 g L⁻¹ a 20 °C, soluções padrão de fipronil foram preparadas neste solvente, grau HPLC. Uma solução estoque de fipronil a 1000,0 μ g mL⁻¹ em metanol foi preparada e armazenada em refrigerador a -4 °C até o momento do uso. A partir da diluição desta solução foram preparadas soluções de trabalho nas concentrações de 10,0 a 1000,0 μ g L⁻¹ de fipronil.

3.4 Fortificação das cascas de ovos

Porções de 1,000 g do material da casca de ovo foram fortificados com 250 μL solução padrão de fipronil a $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ adicionando o volume de forma homogênea com auxílio de uma micropipeta. A solução foi deixada por 10 min à temperatura ambiente para incorporação do agrotóxico e secagem do solvente. Em seguida, o material foi revertido com microespátula para homogeneização das partículas fortificadas. As amostras foram armazenadas em refrigerador a $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento do uso.

3.5 Otimização da SLE-LTP de fipronil de cascas de ovos

3.5.1 Avaliação do solvente extrator

Para avaliar o melhor solvente extrator para SLE-LTP 100 mg de amostra de casca de ovo fortificada com fipronil foram colocados em um frasco do tipo Eppendorf[®] de 5 mL. Foram adicionados ao frasco 500 μL de água ultrapura e, 5 min após, foram adicionados 2,5 mL de solvente extrator (acetonitrila, acetona, metanol ou tolueno). A suspensão foi agitada em agitador vórtex por 1 min, sendo posteriormente submetida a centrifugação a 4000 rpm por 5 min. O frasco foi colocado em freezer a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ para congelamento por 2 h 30 min. Após o período de congelamento, a fase orgânica (solvente extrator) menos densa permaneceu líquida enquanto o material sólido foi congelado na fase aquosa. Foi retirado 1,0 mL da fase orgânica e injetado no HPLC-DAD. O procedimento foi realizado em triplicata.

3.5.2 Planejamento experimental para otimização da SLE-LTP

A extração de fipronil de casca de ovos foi otimizada para obtenção da máxima recuperação do resíduo, sem a interferência de componentes da matriz da amostra. O procedimento de extração descrito anteriormente foi submetido à otimização das variáveis mais importantes para determinação de fipronil nas cascas de ovos. Foi escolhida como ferramenta estatística para a otimização da extração a matriz Doehlert. A matriz Doehlert é uma alternativa bastante útil e atrativa aos planejamentos fatoriais, pois o número de níveis que cada variável possui é variável, permitindo avaliar as variáveis consideradas mais importantes em um número maior de pontos do espaço estudado (FERREIRA *et al.*, 2004; TEÓFILO; FERREIRA, 2006). Além disso, este tipo de

planejamento necessita de um menor número de experimentos em relação ao planejamento composto central sendo, portanto, mais eficiente. As variáveis avaliadas e os níveis estudados em cada variável são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições avaliadas para otimização da SLE/LTP de fipronil de casca de ovos.

Variáveis estudadas	Níveis						
	100	150	200	250	300	-	-
Massa de amostra (mg)	100	150	200	250	300	-	-
Volume de extrator (mL)	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
Tempo de congelamento (h)	2,5	5,0	7,5	-	-	-	-

Para realizar a otimização estatística se faz necessário que as variáveis e os níveis sejam codificados. As variáveis massa de amostra, volume de solvente e tempo de congelamento foram codificadas como x_1 , x_2 e x_3 , respectivamente. Os níveis das variáveis foram codificados utilizando as Equações 1 a 3.

$$x_1 = \frac{(m-200)}{100} \quad \text{Equação 1}$$

$$x_2 = \frac{(V-2,5)}{1,732} \quad \text{Equação 2}$$

$$x_3 = \frac{(t-5)}{3,062} \quad \text{Equação 3}$$

Em que: m é a massa de amostra; V é o volume de solvente; t é o tempo de congelamento; 200, 2,5 e 5 são os níveis centrais das variáveis massa de amostra, volume de solvente e tempo de congelamento, respectivamente; 100, 1,732 e 3,062 se referem às razões entre o nível real (maior valor – valor central) e o nível codificado (maior valor – valor central) de cada variável.

Os níveis codificados das variáveis massa de amostra, volume de solvente extrator e tempo de congelamento na SLE-LTP de fipronil de cascas de ovos foram combinados em 13 experimentos, de acordo com matriz Doehlert, e estão dispostos na Tabela 3. A matriz Doehlert possibilita a avaliação das interações entre as variáveis em seus diferentes níveis e, assim, a obtenção da melhor condição experimental para a extração de fipronil em cascas de ovos.

Tabela 3 - Matriz Doehlert de experimentos para otimização da SLE-LTP de fipronil em casca de ovos.

Exp.	mamostra		V _{solvente}		t _{congelamento}	
	x ₁	mg	x ₂	mL	x ₃	h
1	0	200	0	2,5	0	5,0
2	1	300	0	2,5	0	5,0
3	0,5	250	0,866	4,0	0	5,0
4	0,5	250	0,289	3,0	0,816	7,5
5	-1	100	0	2,5	0	5,0
6	-0,5	150	-0,866	1,0	0	5,0
7	-0,5	150	-0,289	2,0	-0,816	2,5
8	0,5	250	-0,866	1,0	0	5,0
9	0,5	250	-0,289	2,0	-0,816	2,5
10	0	200	0,577	3,5	-0,816	2,5
11	-0,5	150	0,866	4,0	0	5,0
12	-0,5	150	0,289	3,0	0,816	7,5
13	0	200	-0,577	1,5	0,816	7,5

3.6 Análise cromatográfica dos extratos

A separação cromatográfica dos extratos foi realizada empregando fase móvel metanol:H₂O (70:30, v/v), com vazão de 1,2 mL min⁻¹ e detecção DAD a 230 e 280 nm. Foram injetados 20,0 µL dos extratos, mantendo a temperatura do forno da coluna a 30 °C. Foi empregada uma coluna X-Select HSS T3 150 mm × 4,6 mm d.i. recheada com partículas de 3,5 µm de diâmetro.

3.7 Validação do método de determinação de fipronil em cascas de ovos

Para realizar a validação de um método analítico, é necessário avaliar se os resultados obtidos são confiáveis e se o desempenho é apropriado para a finalidade pretendida, neste caso, para a determinação de fipronil em cascas de ovos. Neste trabalho o protocolo escolhido para o estudo de validação do método foi o Guia da Comunidade Europeia para Controle de Qualidade Analítica e Procedimentos de Validação de Métodos para Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos e Rações, documento SANTE/12682/2019 (SANTE, 2020). Os parâmetros analíticos validados foram a seletividade, os limites de detecção e de quantificação, a linearidade, o efeito matriz, a exatidão, a precisão e a robustez.

3.7.1 Seletividade

A seletividade foi determinada pela comparação dos cromatogramas obtidos para a solução padrão de fipronil, para o extrato (matriz fortificada com solução padrão de fipronil) e para o branco (matriz não fortificada). Assim, a eluição individualizada do pico do fipronil sem que haja coeluição de interferentes, seja proveniente da matriz do solvente ou de subprodutos do método, indicaram a seletividade do método.

3.7.2 Limite de quantificação do método

A determinação do limite de quantificação (LOQ, *limit of quantification*) foi realizada através de injeções consecutivas de concentrações decrescentes de solução padrão fipronil até a obtenção de um sinal repetitivo com variação da área de pico inferior a 20 %, em termos de desvio padrão relativo (RSD, *relative standard deviation*). Para tal, foram injetadas concentrações cada vez menores até o desaparecimento do pico do fipronil no cromatograma. Em seguida, foram preparadas três soluções na concentração anterior ao desaparecimento do pico. Essas soluções foram injetadas no HPLC-DAD e então foi calculada a variação da área de pico. A concentração inicial avaliada foi de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.7.3 Faixa dinâmica linear

A faixa dinâmica linear do método, ou faixa de trabalho, foi obtida pela injeção de seis concentrações distintas do analito para a construção da curva analítica. O ajuste adequado de um modelo obtido a partir da regressão linear dos dados é confirmado por um coeficiente de regressão linear (r) maior que 0,99 e coeficiente de determinação (R^2) maior que 0,98. A curva analítica foi construída como sendo a primeira concentração o valor do LOQ e as demais concentrações foram: 5×, 10×, 20×, 30×, 50× e 100× o LOQ.

3.7.4 Efeito matriz

O efeito matriz nos métodos propostos foi calculado a partir da construção de curvas analíticas para o padrão de fipronil preparado em solvente e na matriz das cascas de ovos. A quantificação do efeito matriz foi calculada pela Equação 4.

$$EM(\%) = \frac{S_m - S_s}{S_s} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Em que: S_m é o coeficiente angular da curva na matriz e S_s é o coeficiente angular da curva em solvente.

3.7.5 Exatidão e precisão

A exatidão e a precisão do método foram medidas a partir da aplicação do método otimizado na extração do fipronil em cascas de ovos em duas concentrações diferentes ($5 \times \text{LOQ}$ e $10 \times \text{LOQ}$) e em sextuplicata ($6 \times$) para cada nível testado. Essas medidas foram realizadas em um mesmo dia para avaliar a repetibilidade do método a partir do RSD das repetições. As extrações também foram realizadas em três dias distintos para medir a reprodutibilidade dentro do laboratório (precisão intermediária). A exatidão foi medida pela porcentagem de recuperação dos agrotóxicos, de acordo com o valor fortificado inicialmente, seguindo a Equação 5.

$$R(\%) = \frac{[\text{resíduo}]_{\text{extraído}}}{[\text{resíduo}]_{\text{fortificado}}} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Em que: $R(\%)$ é a porcentagem de recuperação; $[\text{resíduo}]_{\text{extraído}}$ é a concentração de fipronil extraída pelo método SLE-LTP; $[\text{resíduo}]_{\text{fortificado}}$ é a concentração de fipronil adicionada inicialmente na amostra.

3.7.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada utilizando o teste de Youden (YAUDEN; STEINER, 1975). Este teste permite determinar o quanto a resposta de um método analítico é influenciada por pequenas variações dos fatores da extração e análise instrumental e, desta forma, indicar um controle mais rigoroso destes fatores para evitar variações na resposta, garantindo uma maior robustez do método analítico. Os fatores escolhidos devem ser aqueles passíveis de sofrerem variações durante uma análise de rotina empregando o método. Para a avaliação da robustez do método foram avaliadas sete variáveis (representadas por letras) em dois níveis, na condição otimizada (letras **MAIÚSCULAS**) e em uma condição deliberadamente variada (letras **minúsculas**), conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 – Variáveis e níveis estudados para avaliação da robustez pelo teste de Youden.

Variáveis	Níveis			
MeOH na MP (%)	A	70	a	68
Vazão da MP (mL min ⁻¹)	B	1,2	b	1,0
Vol. ACN (mL)	C	2,15	c	2,00
Tempo de congelamento (min)	D	276	d	255
Fornecedor de ACN	E	Lichrosolv	e	Tedia
Vol. Água (mL)	F	0,50	f	0,60
Massa de amostra (mg)	G	275	g	270

MP: *mobile phase* (fase móvel); ACN: acetonitrila; MeOH: metanol

Os níveis otimizados e variados das setes variáveis estudadas foram combinados de acordo com um planejamento experimental proposto pelo teste de Youden (YOU DEN; STEINER, 1975) e a matriz de experimentos realizadas está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 - Combinação fatorial de parâmetros analíticos para avaliação da robustez do método de determinação de fipronil em cascas de ovos pelo teste de Youden.

Variáveis	Combinação dos níveis das variáveis							
MeOH na MP (%)	A	A	A	A	a	a	a	a
Vazão da MP (mL min ⁻¹)	B	B	b	b	B	B	b	b
Vol. ACN (mL)	C	c	C	c	C	c	C	c
Tempo de congelamento (min)	D	D	d	d	d	d	D	D
Fornecedor de ACN	E	e	E	e	e	E	e	E
Vol. Água (mL)	F	f	f	F	F	f	f	F
Massa de amostra (mg)	G	g	g	G	g	G	G	g

A robustez do método foi determinada a partir do cálculo dos efeitos para cada uma das variáveis variadas nas suas condições experimentais. Os efeitos para cada uma das variáveis foram calculados a partir da porcentagem de recuperação do fipronil em cada experimento da Tabela 5, empregando a Equação 6.

$$Ef_{(A)} = \bar{R}_A - \bar{R}_a \quad \text{Equação 6}$$

Em que: $Ef_{(A)}$ é o efeito da variação de metanol na fase móvel durante a execução do método de determinação de fipronil em cascas de ovos; \bar{R}_A é média da recuperação de fipronil na condição otimizada de metanol na

fase móvel; \bar{R}_a é a média da recuperação de fipronil na condição variada deliberadamente de metanol na fase móvel.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

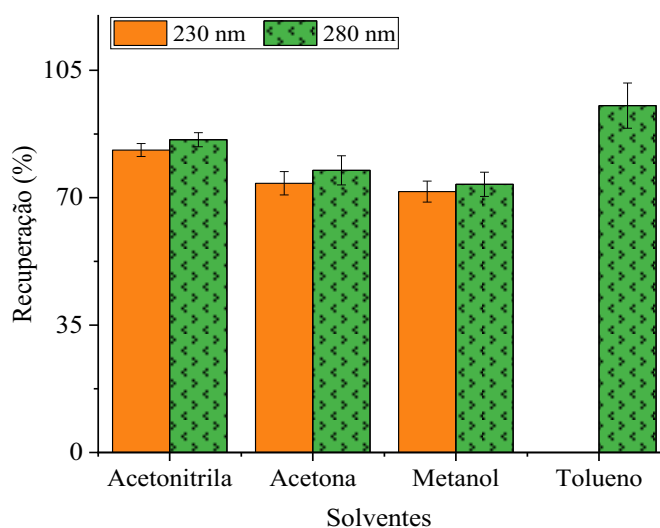
4.1 Otimização da extração de fipronil de cascas de ovos

A quantificação de fipronil em cascas de ovos requer um prévio tratamento da amostra antes da sua análise cromatográfica. No entanto, devido à inexistência de métodos para a extração do fipronil de casca de ovos na literatura, foi necessário desenvolver e otimizar uma metodologia de extração do agrotóxico de forma eficiente e que atendesse as necessidades de redução de resíduos orgânicos gerados, rapidez e simplicidade na sua execução. O método escolhido foi a extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura, pois além de atender esses requisitos apresenta pouca interferência do analista e alta precisão das medidas.

4.1.1 Avaliação do solvente extrator

Para o desenvolvimento do método de extração de fipronil das cascas de ovos via SLE-LTP inicialmente foi necessário avaliar o solvente mais adequado para o processo. Foram avaliados os solventes acetonitrila, acetona e metanol por apresentarem miscibilidade na água, adicionada às amostras para promover o congelamento, e o tolueno, imiscível na água, escolhido por apresentar maior hidrofobicidade. As análises dos extratos foram realizadas por HPLC-DAD em dois comprimentos de onda, nos quais o fipronil absorve, e os resultados obtidos são apresentados na Figura 3. As amostras foram fortificadas com $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de solução padrão de fipronil, empregando 2,5 mL de solvente extrator.

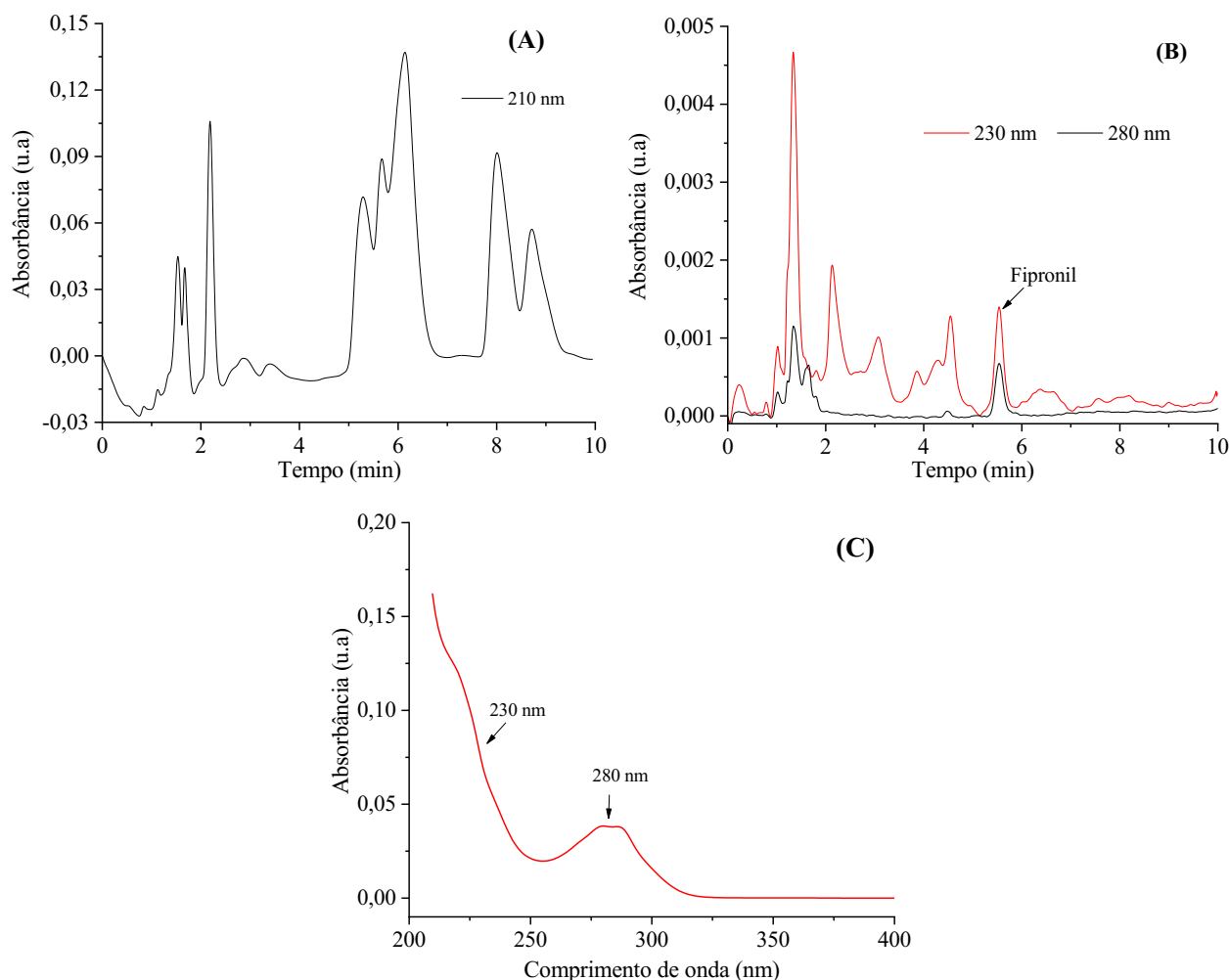
Figura 3 – Porcentagens de recuperação do fipronil de cascas de ovos, empregando diferentes solventes extratores pelo método SLE-LTP.



A extração de compostos, em níveis traço de concentração, de amostras requerem uma precisão com desvios padrão relativos (RSD) inferiores a 20 % e taxas de recuperação entre 70-120 % (SANTE, 2020). Para a avaliação do solvente extrator, de acordo com o apresentado na Figura 3, todos os solventes atendem a este critério. No entanto, a acetonitrila apresenta maior taxa de recuperação nos dois comprimentos de onda avaliados, bem como menor dispersão dos resultados, sendo este o solvente escolhido para o processo de extração do fipronil de casca de ovos.

Os extratos foram analisados em dois comprimentos de onda, 230 e 280 nm, uma vez que normalmente o fipronil é analisado em 210 nm, porém, para a casca de ovo, esta região apresenta picos provenientes da amostra, provavelmente componentes da sua membrana interna, gerando interferência na quantificação do fipronil, Figura 4A. Assim, foi utilizado o comprimento de onda de 230 nm para quantificação do fipronil, promovendo assim um cromatograma mais limpo em relação aos componentes da matriz, como apresentado na Figura 4B. A molécula do fipronil possui uma banda de absorção em 280 nm, como apresentado na varredura espectral apresentada na Figura 4C. Apesar de ser uma banda de menor intensidade possibilita a confirmação do pico do fipronil já que componentes da matriz não absorvem nessa região.

Figura 4 – Cromatograma dos extratos de cascas de ovos obtidos pelo método SLE-LTP e analisado por HPLC-DAD nos comprimentos: (A) 210 nm e (B) 230 e 280 nm. (C) Espectro de absorção no UV para o pico do fipronil analisado em 5,6 min no HPLC. Condições de análise: fase móvel MeOH:H₂O(70:30, v/v), vazão 1,2 mL min⁻¹ e temperatura de 30 °C.



Na Figura 4 pode-se observar a absorção de fipronil em dois comprimentos de onda, 230 nm e 280 nm. É possível detectar o fipronil em ambos os comprimentos, mas em 230 nm é possível obter uma maior detectabilidade, maior intensidade de pico. Ao observar a quantidade significativa de picos presentes no comprimento de onda de 230 nm pode-se afirmar que além do fipronil, esse comprimento de onda também é capaz de detectar outros componentes da matriz que são coextraídos pelo método SLE-LTP. Já em 280 nm é possível observar praticamente apenas o pico do fipronil após 2 min de análise. O espectro UV do fipronil (Figura 4B) confirma que a molécula de fipronil absorve mais radiação em 230 nm do que em 280 nm.

4.1.2 Aplicação da matriz Doehlert na otimização da SLE-LTP de fipronil de cascas de ovos

Para a otimização da extração do fipronil de casca de ovos foi empregado um planejamento estatístico baseado na matriz Doehlert. Esse tipo de planejamento permite a avaliação simultânea de várias variáveis que podem afetar a extração do fipronil, possibilitando a priorização de variáveis consideradas mais importantes no estudo pela sua avaliação em mais níveis. Desta forma, a massa de casca de ovo, o volume de solvente extrator e o tempo de congelamento no método SLE-LTP foram estudados empregando a matriz Doehlert. Foram realizados 13 experimentos combinando diferentes condições das três variáveis, de acordo com a matriz de planejamento Doehlert apresentada na Tabela 3. As porcentagens de recuperação do fipronil obtidas em cada experimento estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Porcentagem de recuperação do fipronil de cascas de ovos pelo método SLE-LTP na otimização empregando a matriz Doehlert.

Exp.	X ₁ (massa amostra)	X ₂ (volume de acn)	X ₃ (t. congelamento)	R (%)
1	0	0	0	97,7
2	1	0	0	93,9
3	0,5	0,866	0	92,6
4	0,5	0,2887	0,8165	77,2
5	-1	0	0	95,9
6	-0,5	-0,866	0	71,4
7	-0,5	-0,2887	-0,8165	76,5
8	0,5	-0,866	0	94,4
9	0,5	-0,2887	-0,8165	76,0
10	0	0,5774	-0,8165	97,2
11	-0,5	0,866	0	104,2
12	-0,5	0,2887	0,8165	87,4
13	0	-0,5774	0,8165	78,9

A aceitação de um resultado de recuperação de resíduos de agrotóxicos em amostras diversas varia entre 70 % e 120 % (SANTE, 2020), de acordo com a Tabela 6, os 13 experimentos da matriz Doehlert apresentam recuperações dentro desta faixa. Logo, o método parece ser adequado para a extração de fipronil de cascas de ovos. Os resultados de recuperação de fipronil das cascas de ovos, empregando a matriz Doehlert, foram utilizados para construir um modelo matemático que permita prever as condições das variáveis que resultem na maior porcentagem possível de recuperação de

fipronil. Este modelo é obtido a partir da combinação das variáveis apresentada na Tabela 6. Os coeficientes deste modelo polinomial foram determinados usando o Microsoft Excel® de acordo com as planilhas disponibilizadas por TEÓFILO e FERREIRA (2006). O modelo quadrático foi o melhor ajustado para explicar a recuperação do fipronil de cascas de ovos pelo método SLE-LTP. A Tabela 7 apresenta os valores dos coeficientes do modelo quadrático de previsão da recuperação de fipronil.

Tabela 7 - Coeficientes estimados para o modelo quadrático obtido do planejamento experimental com a matriz Doehlert e suas significâncias estatísticas ao nível de 95% de probabilidade.

Coeficientes	Valor	Erro	Teste t	p-valor
Constante	97,33	± 1,18	82,614	0,00015
x₁	-0,41	± 1,02	0,402	0,72666
x₂	10,21	± 1,02	10,008	0,00984
x₃	-1,28	± 1,02	1,253	0,33698
x₁²	-2,42	± 1,86	1,297	0,32399
x₂²	-8,10	± 1,86	4,350	0,04899
x₃²	-20,04	± 1,76	11,354	0,00767
x₁ × x₂	-19,95	± 2,36	8,468	0,01366
x₁ × x₃	1,10	± 2,63	0,417	0,71728
x₂ × x₃	-14,36	± 2,63	5,453	0,03202

Em vermelho, coeficientes do modelo estatisticamente significativos (< 0,05).

De acordo com a Tabela 7, considerando apenas os coeficientes estatisticamente significativos ao nível de 95 % de probabilidade pelo teste *t*, o modelo quadrático que descreve a recuperação do fipronil extraído das amostras de cascas de ovos pelo método SLE-LTP pode ser descrito pela Equação 7.

$$R (\%) = 97,3 + 10,2 \cdot x_2 - 8,1 \cdot x_2^2 - 20,04 \cdot x_3^2 - 19,9 \cdot x_1 \cdot x_2 - 14,4 \cdot x_2 \cdot x_3 \quad \text{Equação 7}$$

De acordo com o modelo de previsão das recuperações de fipronil de cascas de ovos na Equação 7, apenas o volume de solvente (x_2) foi significativo, porém as interações entre as variáveis estudadas também se mostraram significativas, justificando a necessidade do planejamento experimental. A validade estatística deste modelo pode ser confirmada pela Análise de Variância (ANOVA), apresentada na Tabela 8.

Tabela 8 - Análise de variância do modelo quadrático para otimização da extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura de fipronil de casca de ovos.

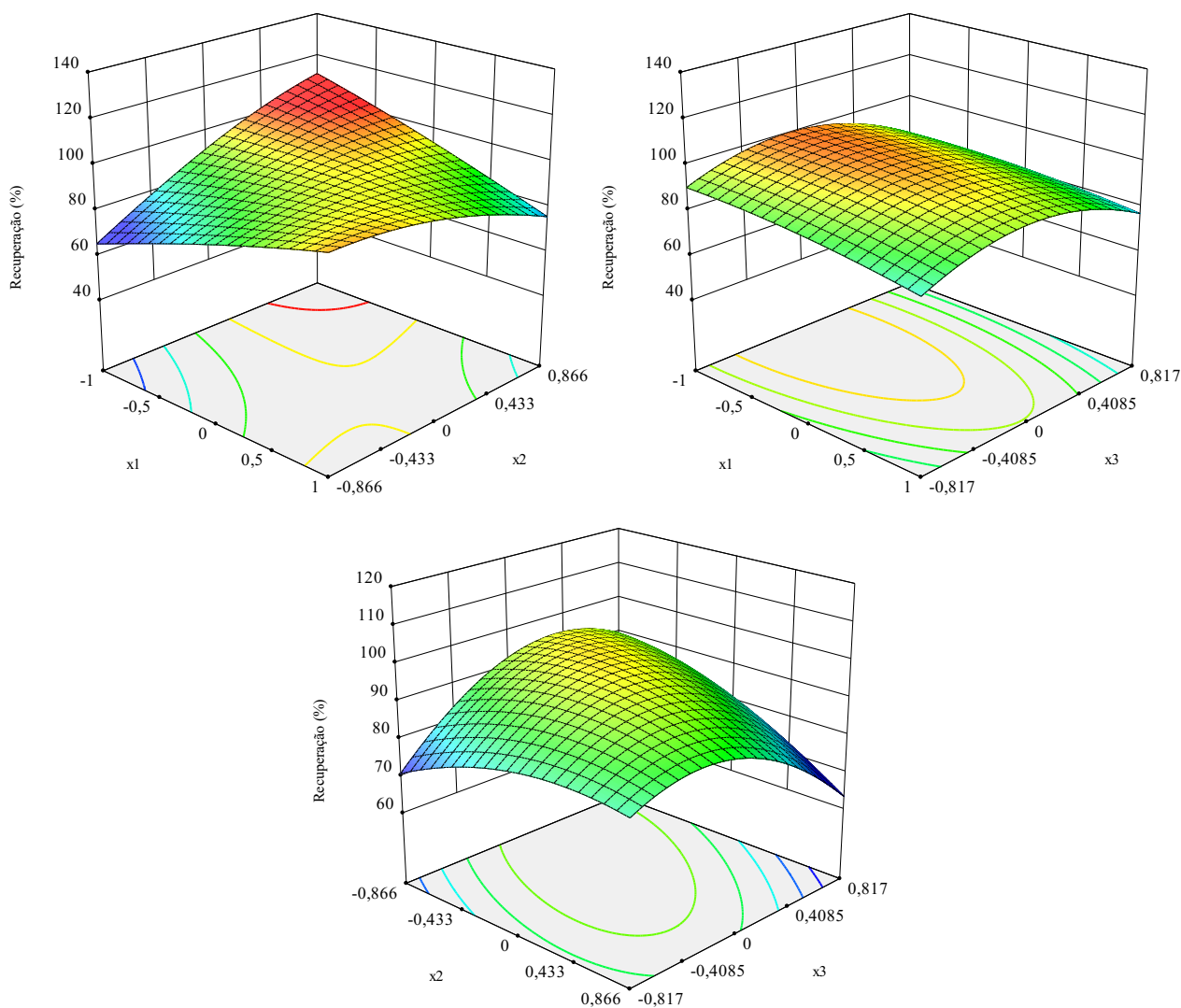
Fonte de variação	SQ	graus de liberdade	MQ	Teste F	p-valor
Regressão	1414,6	9	157,17	8,7005	0.01411
Resíduos	90,325	5	18,065		
Falta de Ajuste	81,998	3	27,333	6,5644	0.13505
Erro Puro	8,3275	2	4,1637		
Total	1504,9	14			
	% variação explicada			93,998	
	% máx. de variação explicável			99,447	

Em vermelho, fontes estatisticamente significativas (< 0,05).

De acordo com a ANOVA na Tabela 8, o modelo quadrático da Equação 7 apresenta-se bem ajustado aos resultados experimentais de extração do fipronil das amostras de cascas de ovos. Este ajuste pode ser confirmado pela significância estatística, ao nível de 95 % de probabilidade pelo teste F, do modelo de regressão e da insignificância estatística da falta de ajuste (valor de p maior que 0,05). Além disso, 94,0 % das variações ocorridas no experimento podem ser explicadas (R^2 ajustado) pelo modelo proposto em face dos 99,4 % das variações explicáveis (R^2).

O modelo quadrático proposto para explicar a recuperação do fipronil de cascas de ovos pode ser mais bem interpretado a partir dos gráficos tridimensionais das superfícies de respostas apresentados na Figura 5.

Figura 5 - Superfícies de respostas para a extração de fipronil de cascas de ovos de acordo com o modelo quadrático ajustado para otimização do método SLE-LTP.



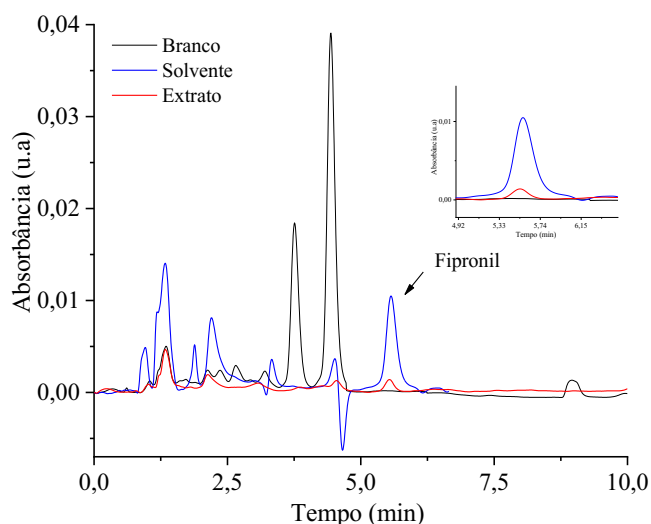
Como pode ser observado pelas superfícies de respostas, a máxima extração do fipronil de casca de ovos não está claramente compreendida dentro da região investigada. No entanto, as maiores taxas de extração do fipronil dentro da região investigada são alcançadas quando se empregam aproximadamente 275 mg de massa de amostra, 2,15 mL de acetonitrila e 4,5 h de tempo de congelamento. Esses valores foram decodificados das Equações 1 a 3 a partir do máximo para cada variável extraído das superfícies de respostas da Figura 5.

4.2 Validação do método de determinação de fipronil em cascas de ovos

4.2.1 Avaliação do solvente extrator

A seletividade do método de determinação de fipronil em cascas de ovos foi avaliada através da interferência no pico do inseticida registrada nos cromatogramas de uma solução padrão de fipronil preparado em solvente, no extrato e no branco do extrato obtido pela SLE-LTP. Na Figura 6 são apresentados os cromatogramas destas análises.

Figura 6 - Cromatograma das soluções de fipronil preparadas em solvente, no extrato e no branco da SLE-LTP de amostras de cascas de ovos. Condições: MeOH:H₂O(70:30, v/v), vazão 1,2 mL min⁻¹, temperatura 30 °C e detecção DAD a 230 nm.



Através da Figura 6 foi possível observar que o pico referente ao fipronil foi eluído isoladamente, sem interferência dos demais componentes da matriz no comprimento de onda de 230 nm. De acordo com o documento SANTE/12682/2019 o método pode ser considerado seletivo quando o sinal do analito não é afetado pelos coextrativos da matriz da amostra ou quando a interferência de coextrativos no pico do analito é inferior a 30 % da área total de pico do analito (SANTE, 2020). Considerando a prerrogativa do guia de validação e os cromatogramas obtidos pode-se considerar que o método desenvolvido é seletivo para determinação de fipronil em cascas de ovos.

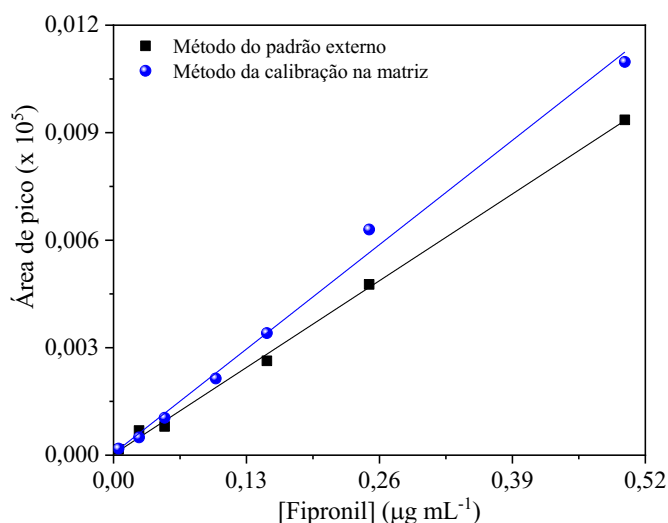
4.2.2 Limite de quantificação

O limite de quantificação é uma figura de mérito muito importante quando se pensa em desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos, visto que o LOQ é a menor concentração do composto em uma dada matriz que o método consegue quantificar com precisão e exatidão. Para obtenção do limite de quantificação foi realizada a injeção de extratos diluídos contendo fipronil até obtenção da menor concentração com área repetitiva ($RSD < 20\%$) para medidas realizadas em triplicata. Assim, foram obtidas áreas de 171, 193 e 187 para a análise em triplicata de solução de fipronil a $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (equivalente a $8,4 \mu\text{g kg}^{-1}$) preparada em extrato da SLE-LTP de cascas de ovos. O desvio padrão relativo para esta medida foi de $6,20\%$, atendendo ao critério de aceitação sugerido pela Comunidade Europeia (SANTE, 2020). A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura define o limite máximo de resíduos (MRL, *maximum residue limit*) para o fipronil em diferentes matrizes, e o valor mais baixo é de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ para ovos (TU *et al.*, 2019; FAO, 2019). Portanto, o LOQ obtido para o método é inferior ao MRL estabelecido para o fipronil em alimentos, sendo adequado para identificação de contaminação na amostra pretendida.

4.2.3 Faixa dinâmica linear

Para avaliar a faixa de concentrações do fipronil que responde de forma linear no método proposto foram construídas duas curvas analíticas pelos métodos do padrão externo e pelo método da calibração na matriz. Na Figura 7 estão apresentadas as curvas analíticas obtidas para o fipronil por estes métodos.

Figura 7 - Curvas analíticas do fipronil obtidas pelo método do padrão externo e pelo método da calibração na matriz.



Os parâmetros das curvas analíticas são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Parâmetros analíticos das curvas de calibração do fipronil obtidas pelos métodos do padrão externo (preparada em solvente) e da calibração na matriz (preparada no extrato do branco).

Parâmetros analíticos	Curvas analíticas	
	Preparada em solvente	Preparada na matriz
Coefficiente de regressão (r)	0,9991	0,9970
Coefficiente de determinação (R²)	0,9970	0,9928
Coefficiente angular	18623,8	22041,9
Coefficiente linear	26,3	49,5
Equação da reta	$A = 26,3 + 18623,8 \cdot C_{\text{Fipronil}}$	$A = 49,5 + 22041,9 \cdot C_{\text{Fipronil}}$
Faixa de trabalho (µg mL⁻¹)	0,005 a 0,500	0,005 a 0,500

Como pode ser observado na Tabela 10, os coeficientes de regressão linear (r) e de determinação (R²) obtidos pelo método dos mínimos quadrados, apresentam valores superiores a 0,99 e 0,98, respectivamente, que é o critério de aceitação do guia de validação SANTE/12682/2019 para a linearidade do método (SANTE, 2020). Portanto, os modelos lineares obtidos para a SLE-LTP do fipronil em cascas de ovos foram bem ajustados. Assim, a faixa de trabalho (ou faixa dinâmica linear) para calibração dos resultados ficou na faixa de 0,005-0,500 µg mL⁻¹.

4.2.4 Efeito matriz

O efeito matriz do método de determinação do fipronil em cascas de ovos, proposto neste trabalho, também foi determinado a partir das curvas analíticas do fipronil preparadas em solvente e no extrato da matriz. O efeito matriz foi determinado qualitativamente através da comparação das inclinações das curvas, em que a falta de paralelismo entre as duas retas indica a presença de efeito matriz no método. Como pode ser observado na Figura 7, as retas não são totalmente paralelas, portanto, apresentam efeito matriz. Esse efeito matriz foi quantificado a partir da Equação 4 para avaliar sua importância na resposta. O valor encontrado foi de +18,3 %, indicando que a presença de componentes da matriz no extrato aumenta a resposta do fipronil. Porém, a porcentagem do efeito matriz pode ser considerada não significativa, ou o método ser isento de efeito matriz, quando se encontra abaixo de 20 % (ECONOMOU et al., 2009). Assim, o método não apresenta efeito matriz significativo na determinação de fipronil nas amostras de cascas de ovos.

4.2.5 Exatidão e precisão do método

Quando se propõe novos métodos analíticos se faz necessário que se avalie a precisão e exatidão do método. Esses parâmetros foram medidos através das extrações SLE-LTP de fipronil de cascas de ovos pelo método otimizado em sextuplicatas a partir de dois níveis de fortificação das amostras. As extrações foram realizadas também em três dias distintos para avaliação da reprodutibilidade do método dentro do laboratório (ensaio inter-dias ou precisão intermediária). A precisão do método foi obtida pelos valores de RSD das medidas realizadas em um mesmo dia ou em dias diferentes. A exatidão do método SLE-LTP foi avaliada a partir de ensaios de recuperação do fipronil fortificado nas cascas de ovos. As porcentagens de recuperação foram as medidas da exatidão do método. Os valores de recuperação e de desvios padrão relativos para os ensaios realizados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Porcentagens de recuperação do fipronil em cascas de ovos, empregando o método SLE-LTP.

[Fipronil] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1º dia			2º dia		3º dia		Total
	n	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	RSD (%)
25,0 (5×LOQ)	1	93,0		92,0		107,0		
	2	89,3		92,6		95,5		
	3	91,6	2,82	105,7	5,83	106,4	7,02	6,14
	4	88,0		98,5		99,8		
	5	95,0		99,1		89,7		
	6	93,0		91,6		94,9		
50,0 (10×LOQ)	1	99,1		101,0		102,3		
	2	95,2		107,6		102,2		
	3	100,1	4,84	107,8	5,11	100,0	7,06	7,00
	4	89,4		104,8		115,0		
	5	89,6		100,0		93,3		
	6	93,3		94,2		99,3		

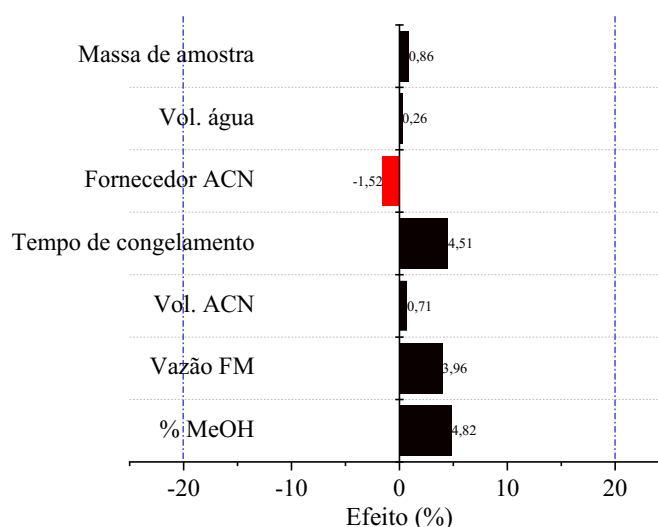
Avaliando os dados apresentados na Tabela 10 para as extrações em dois níveis distintos de fortificação de fipronil nas cascas de ovos foi possível recuperar o inseticida com taxas de 88,0-115,0 % e com desvios padrão relativos inferiores a 7,06 %. De acordo com o guia de validação SANTE/12682/2019 para que um método seja considerado preciso é necessário que um RSD seja inferior a 20 %. Assim, o método SLE-LTP pode ser considerado preciso, tanto em nível de repetibilidade (precisão intra dia) quanto de reprodutibilidade dentro do laboratório (precisão entre dias). O método pode ser considerado de boa exatidão, uma vez que as taxas de recuperação obtidas para o fipronil neste estudo ficou dentro da faixa de 70-120 % (SANTE, 2020).

O método SLE-LTP para a extração de fipronil de cascas de ovos apresentou resultados de exatidão e precisão no mínimo similares a outros métodos na literatura. Para citar alguns exemplos, o método SLE-LTP empregado para extração de agrotóxicos de ovos de jacaré obteve taxa de recuperação média de 61 % com RSD de 15 % para os agrotóxicos organofosforados (SOUSA *et al.*, 2014). A determinação de fipronil em carnes e gordura bovina, empregando o método QuEChERS, apresentou taxas de recuperação 70-112 % com RSD 1-27 % (SARTARELLI *et al.*, 2012).

4.2.6 Estudo da robustez do método

Para avaliar a robustez do método de determinação de fipronil de cascas de ovos foi aplicado o teste de Youden (YOU DEN; STEINER, 1975). Pequenas modificações foram realizadas nas condições otimizadas de sete variáveis do método proposto. De acordo com o teste proposto por Youden, foram realizadas oito extrações do fipronil das cascas de ovos pelo método SLE-LTP, combinando as condições otimizadas e ligeiramente modificadas das sete variáveis (Tabela 4). Estas variações simulam pequenas alterações nas condições do método durante as análises de rotina. A robustez do método analítico foi determinada a partir dos efeitos de cada variável nos dois níveis estudados a partir da diferença de recuperação do fipronil nestas condições, ou seja, a robustez do método foi medida pela diferença das taxas de recuperação na condição ótima e na modificada para sete variáveis. Os resultados destes efeitos estão apresentados na Figura 8.

Figura 8 – Avaliação da robustez do método SLE-LTP a partir da variação deliberada dos níveis de sete variáveis, conforme sugerido por YOU DEN e STEINER (1975).



De acordo com os resultados da Figura 8, o método de determinação do fipronil em cascas de ovos mostrou que pequenas variações das condições experimentais na preparação das amostras (método SLE-LTP) e na quantificação (HPLC-DAD) não alteram de forma significativa a taxa de recuperação do fipronil. A maior diferença nas taxas de recuperações ocorreu para mudança da composição da fase móvel em termos da porcentagem de metanol em 2 %, de 70 % para 68 %. Essa mudança altera o tempo de retenção do fipronil e dos componentes da amostra coextraídos pelo método, afetando a resposta em 4,82 %. Considerando que a variação da taxa de recuperação no

estudo ficou dentro da faixa de 70 a 120 % para todas as condições avaliadas, o método se mostra robusto para análises de rotinas.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi desenvolvido e otimizado um método de extração (ESL-PBT) de resíduos de agrotóxico em cascas de ovos, com análise por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção UV por arranjo de diodos, o qual mostrou ótima eficiência na recuperação e detectabilidade adequada para a determinação de resíduos do agrotóxico fipronil.

As figuras de método avaliadas, como a seletividade, o LOQ, a linearidade, o efeito matriz, a exatidão/precisão e a robustez mostraram que o método proposto é adequado para a finalidade desejada, atendendo os critérios de aceitação de agências regulamentadoras nacionais e internacionais. Apesar do detector não apresentar níveis de detectabilidade na mesma ordem de grandeza da espectrometria de massas, o detector por arranjo de diodos possibilitou valores de LOQ para o fipronil no mínimo comparáveis a outros métodos disponíveis na literatura e abaixo do limite máximo residual para o fipronil em ovos.

As aplicações realizadas que foram citadas acima tiveram seu método e resultados utilizados na escrita de um artigo recém-publicado na revista *Microchemical Journal*.

REFERÊNCIAS

- AKRAM, S.; MUSHTAQ, M. Techniques to Detect and Detoxify Organophosphorus Pesticides from Fruit Juices, p. 363-389. IN: Fruit Juices - Extraction, Composition, Quality and Analysis. London: Academic Press, **2018**. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00019-9>
- ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, v. 86, p. 412-431, **2003**. DOI: <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Reclassificação toxicológica dos agrotóxicos. Resolução RE nº 2.080, de 31 de julho de 2019. **2019**. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-re-n-2080-de-31-de-julho-de-2019-208203097>. Acesso em: 31 out. 2021.
- ARES, A.M.; FERNÁNDEZ, P.; REGENJO, M.; FERNÁNDEZ, A.M.; CARRO, A.M.; LORENZO, R.A. A fast bioanalytical method based on microextraction by packed sorbent and UPLC–MS/MS for determining new psychoactive substances in oral fluid. *Talanta*, v. 174, p. 454-461, **2017**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.022>
- BARRETO, A.S.; ANDRADE, P.C.S.; FARIAS, J.M.; MENEZES FILHO, A.; SÁ, G.F.; ALVES JÚNIOR, S. Characterization and application of a lanthanide-based metal–organic framework in the development and validation of a matrix solid-phase dispersion procedure for pesticide extraction on peppers (*Capsicum annuum L.*) with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, v. 41, p. 1593-1599, **2018**. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.201700812>
- BATISTELLA, A.M.; VOGT, R.C. Nesting Ecology of Podocnemis erythrocephala (Testudines, Podocnemididae) of the Rio Negro, Amazonas, Brazil. *Chelonian Conservation and Biology*, v. 7, p. 12-20, **2008**. DOI: <https://doi.org/10.2744/CCB-0611.1>
- BONMATIN, J.M.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D.P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; LONG, E.; MARZARO, M.; MITCHELL, E.A.D.; NOOME, D.A.; SIMON-DELISO, N.; TAPPARO, A. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental Science Pollution Research*, v. 22, p. 35-67, **2015**. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3332-7>
- BRAIBANTE, M.E.F.; ZAPPE, J.A. A química dos agrotóxicos. *Química Nova na Escola*, v. 34, p. 10-15, **2012**.
- BROCHARDT, V.; LONDRES, F. O veneno (ainda) está no prato. Quais as opções para uma alimentação sem agrotóxicos? *Revista Revestres*, **2021**. Disponível em: <https://revistarevestres.com.br/artigos/o-veneno-ainda-esta-no-prato>. Acesso em: 27 jul. 2021.
- CARNEIRO, I.V.; VIEIRA, L.G.; MENDONÇA, J.S.; HIRANO, L.Q.L.; VALDES, S.A.C.; MENEZES-REIS, L.T.; SANTOS, A.L.Q. Development of scleral ossicles in Podocnemis expansa (Testudines: Podocnemididae) embryos exposed to atrazine. *Drug and Chemical Toxicology*, v. 44, p. 353-358, **2021**. DOI: <https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1598427>
- CASTILHOS, D.; DOMBROSKI, J.L.D.; BERGAMO, G.C.; GRAMACHO, K.P.; GONÇALVES, L.S. Neonicotinoids and fipronil concentrations in honeybees associated with pesticide use in Brazilian agricultural areas. *Apidologie*, v. 50, p. 657-668, **2019**. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00676-x>
- CASTRO-LIMA, J.A.M.; LABANOWSKI, J.; BASTOS, M.C.; ZANELLA, R.; PRESTES, O.D.; VARGAS, J.P.R.; MONDAMERT, L.; GRANADO, E.; TIECHER, T.; ZAFAR, M.; TROIAN, A.; LE GUET, T.; SANTOS, D.R. “Modern agriculture” transfers many pesticides to watercourses: a case study of a representative rural catchment of southern Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, p. 10581-10598, **2020**. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06550-8>

CHAGURI, J.L. Efeitos da exposição ao pesticida fipronil nas alterações pressóricas em ratos acordados. 2016. 49 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia e Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, **2016**. <http://hdl.handle.net/11449/137936>

CHAULET, F.C.; BARCELLOS, H.H.A.; FIOR, D.; POMPERMAIER, A.; KOAKOSKI, G.; ROSA, J.G.S.; FAGUNDES, M.; BARCELLOS, L.J.G. Glyphosate- and fipronil-based agrochemicals and their mixtures change zebrafish behavior. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, v. 77, p. 443-451, **2019**. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00644-7>

EC – European Commission. Summary report of the standing committee on plants, animals, food and feed held in Brussels on 30 August 2017. Disponível em: <https://circabc.europa.eu/w/browse/b4cd5d32-6ca6-4f18-8a5d-f60758e77065>. Acesso em: 15 nov. 2021.

ECONOMOU, A.; BOTITSI, H.; ANTONIOU, S.; TSIPI, D. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 5856-5867, **2009**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.031>

EWERT, M.A. The embryo and its egg: development and natural history, p. 333-413. In: HARLESS, M.; MORLOCK, M. (Eds). *Turtles: Perspectives and Research*. New York: John Wiley and Sons, XIV+695p, **1979**.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Codex pesticides residues in food online database. **2019**. Disponível em: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/en/>. Acesso em: 10 set. 2021.

FERREIRA, M.O. Otimização do método de extração sólido-líquido com partição à baixa temperatura de resíduos de agrotóxicos em polpa de pequi. 2019. 59 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba, **2019**. <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/27935>

FERREIRA, S.L.C.; SANTOS, W.N.L.; QUINTELLA, C.M.; BARROS NETO, B.; BOSQUE-SENDRA, J.M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry-review. *Talanta*, v. 63, p. 1060-1067, **2004**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.01.015>

FORERO-MEDINA, G.; FERRARA, C.R.; VOGT, R.C.; FAGUNDES, C.K.; BALESTRA, R.A.M.; ANDRADE, P.C.M.; LACAVA, R.; BERNHARD, R.; LIPMAN, A.J.; LENZ, A.J.; FERRER, A.; CALLE, A.; APONTE, A.F.; CALLE-RENDÓN, B.R.; CAMILO, C.S.; PERRONE, E.; MIRAÑA, E.; CUNHA, F.A.G.; LOJA, E.; DEL RIO, J.; FERNANDEZ, J.L.V.; HERNÁNDEZ, O.E.; DEL AGUILA, R.; PINO, R.; CUEVA, R.; MARTINEZ, S.; BERNARDES, V.C.D.; SAINZ, L.; HORNE, B.D. On the future of the giant South American river turtle *Podocnemis expansa*. *Oryx*, v. 55, p. 73-80, **2019**. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0030605318001370>

FREITAS, S.S.; SERAFIM, F.A.T.; LANÇAS, F.M. Determination of target pesticide residues in tropical fruits employing matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction followed by high resolution gas chromatography. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 29, p.1140-1148, **2018**. DOI: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180041>

GIROUD, B.; BRUCKNER, S.; STRAUB, L.; NEUMANN, P.; WILLIAMS, G.R.; VULLIET, E. Trace-level determination of two neonicotinoid insecticide residues in honey bee royal jelly using ultra-sound assisted salting-out liquid liquid extraction followed by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*, v. 151, 104249, **2019**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104249>

GOULART, S.M.; ALVES, R.D.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, J.H.; ASSIS, T.C.; QUEIROZ, M.E.L.R. Optimization and validation of liquid-liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. *Analytical Chimica Acta*, v. 671, p. 41-47, **2010**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.05.003>

- GUEDES, T.A. Fipronil e ethiprole: um estudo comparativo em organismos não alvos. 2019. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, **2019**. <http://hdl.handle.net/11449/191027>
- GUNASEKARA, A.S.; TRUONG, T.; GOH, K.S.; SPURLOCK, F.; TJEERDEMA, R.S. Environmental fate and toxicology of fipronil. *Journal of Pesticide Science*, v. 32, p. 189-197, **2007**. DOI: <https://doi.org/10.1584/jpestics.R07-02>
- IVERSON, J.B. A revised checklist with distribution maps of the turtles of the world, Richmond, Indiana: Privately Printed. 374p. **1992**.
- JARDIM, I.C.S.F.; ANDRADE, J.A.; QUEIROZ, S.C.N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - Um enfoque às maçãs. *Química Nova*, v. 32, p. 996-1012, **2009**. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000400031>
- LI, G.; ROW, K.H. Selective extraction of 3,4-dihydroxybenzoic acid in *Ilex chinensis* Sims by meticulous mini-solid-phase microextraction using ternary deep eutectic solvent-based molecularly imprinted polymers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 410, p. 7849-7858, **2018**. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1406-y>
- NAYAK, R.; MANNING, L.; WATERSON, P. Exploration of the fipronil in egg contamination incident in the Netherlands using the Functional Resonance Analysis Method. *Food Control*, v. 133, 108605, **2022**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108605>
- OLIVEIRA, J.S.P.; VIEIRA, L.G.; CARVALHO, W.F.; SOUZA, M.B.; RODRIGUES, A.S.L.; SIMÕES, K.; SILVA, D.M.; MENDONÇA, J.S.; HIRANO, L.Q.L.; SANTOS, A.L.Q.; MALAFAIA, G. Mutagenic, genotoxic and morphotoxic potential of different pesticides in the erythrocytes of *Podocnemis expansa* neonates. *Science of The Total Environment*, v. 737, 140304, **2020**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140304>
- PACKARD, M.J.; DEMARCO, V.G. Eggshell structure and formation in eggs of oviparous reptiles, p. 53-70. In: DEEMING, D.C.; FERGUSON, M.W.J. (eds). *Egg Incubation Its effects on embryonic development in birds and reptiles*. Londres: Cambridge University Press, **1991**. DOI: <https://doi.org/10.1017/CBO9780511585739.006>
- PELAJIC, M.; PECEK, G.; PAVLOVIC, D.M.; CEPO, D.V. Novel multiresidue method for determination of pesticides in red wine using gas chromatography–mass spectrometry and solid phase extraction. *Food Chemistry*, v. 200, p. 98-106, **2016**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.018>
- PERES, F.; MOREIRA, J.C. *É veneno ou é remédio? agrotóxicos, saúde e ambiente*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, **2003**. ISBN 978-85-7541-317-3.
- PORTO, M.F.; SOARES, W.L. Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisa inovadora. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, v. 37, p. 17-50, **2012**. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0303-76572012000100004>
- PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. *Scientia Chromatographica*, v. 3, p. 51-64, **2011**. DOI: <https://doi.org/10.4322/sc.2011.004>
- PUBCHEM, Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fipronil>. Acesso em: 10 out. 2021.
- REIGART, J.R.; ROBERTS, J.R. *Recognition and management of pesticide poisonings*. 6th ed, Washington: EPA. 277p. **2013**.
- RIBAS, P.P.; MATSUMURA, A.T.S. *A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente*. *Liberato*, v. 10, p. 149-158, **2009**. DOI: <https://doi.org/10.31514/rliberato.2009v10n14.p149>
- RODRIGUES, R.P.; FARIAS, W.R; GOULART, S.M.; GOULART, A.C.; SANTOS, J.P.V.; QUEIROZ, M.E.L.R. otimização da extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura para determinação de

carbofurano em *Cucurbita pepo* L (“abobrinha”) por cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, v. 41, p. 213-218, **2018**. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170141>

ROSSI, M. O “alarmante” uso de agrotóxicos no Brasil atinge 70% dos alimentos. El País, **2015**. Disponível em: https://brasil.elpais.com/brasil/2015/04/29/politica/1430321822_851653.html. Acesso em 19 nov. 2021.

RUEDA-ALMONACID, J.V.; CARR, J.L.; MITTERMEIER, R.A.; RODRÍGUEZ-MAHECHA, J.V.; MAST, R.B.; VOGT, R.C.; RHODIN, A.G.J.; OSSA-VELÁSQUEZ, J.; RUEDA, J.N.; MITTERMEIER, C.G. Las tortugas y los cocodrilianos de los países andinos del trópico. Washington: Conservación Internacional, 271p. **2007**.

SANTANA, E.T.D.; SOARES, D.F.; FARIA, A.M. Development of a methodology for the determination of pesticide residues in Cajá-Manga pulp (*Spondias dulcis* L.) using solid-liquid extraction with low-temperature partitioning. *Journal of Chemistry*, v. 2018, 6012503, **2018**. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/6012503>

SANTE - European Commission Reference Laboratories (EURL), document SANTE/12682/2019. Analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/system/files/2020-01/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2019-12682.pdf, **2020**. Acesso em: 27 ago. 2021.

SARTARELLI, N.C.; MACEDO, A.N.; SOUSA, J.P.; NOGUEIRA, A.R.A.; BRONDI, S.H.G. Determination of chlorfenvinphos, fipronil, and cypermethrin residues in meat and bovine fat using QuEChERS method and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, v. 35, p. 1895-1908, **2012**. DOI: <https://doi.org/10.1080/10826076.2011.627609>

SCORZA-JÚNIOR, R.P.; FRANCO, A.A. Environmental behavior of sulfentrazone and fipronil in a Brazilian clayey latosol: field experiment and simulation. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 38, p. 415-423, **2014**. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542014000500001>

SILVA, C.M.M.; FAY, E.F. Agrotóxicos e ambiente. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, **2004**.

SILVA, E.A.S.; PAWLISZYN, J. Direct immersion solid-phase microextraction with matrix-compatible fiber coating for multiresidue pesticide analysis of grapes by gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (DI-SPME-GC-ToFMS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, p. 4464-4477, **2015**. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf506212j>

SILVÉRIO, F.O.; SILVA, J.G.S.; AGUIAR, M.C.S.; CACIQUE, A.P.; PINHO, G.P. Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, v. 35, p. 2052-2056, **2012**. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012001000027>

SIMON-DELISO, N.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L.P.; BONMATIN, J.M.; CHAGNON, M.; DOWNS, C.; FURLAN, L.; GIBBONS, D.W.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D.P.; KRUPKE, C.H.; LIESS, M.; LONG, E.; MCFIELD, M.; MINEAU, P.; MITCHELL, E.A.D.; MORRISSEY, C.A.; NOOME, D.A.; PISA, L.; SETTELE, J.; STARK, J.D.; TAPPARO, A.; VAN DYCK, H.; VAN PRAAGH, J.; VAN DER SLUIJS, J.P.; WHITEHORN, P.R.; WIEMERS, M. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science of Pollution Research*, v. 22, p. 5-34, **2015**. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y>

SOUSA, D.A.; GONÇALVES, R.M.; HELENO, F.F.; QUEIROZ, M.E.L.R.; MARCHI, M.R.R. Chemometric optimization of solid-liquid extraction with low-temperature partition (SLE-LTP) for determination of persistent organic pollutants in Caiman yacare eggs. *Microchemical Journal*, v. 114, p. 266-272, **2014**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2014.01.012>

SPADOTTO, C.A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. *Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar*, p. 1-9, **2006**.

TEÓFILO, R.F.; FERREIRA, M.M.C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Química Nova*, v. 29, p. 338-350, **2006**. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000200026>

TINGLE, C.C.D.; ROTHER, J.A.; DEWHURST, C.F.; LAUER, S.; KING, W.J. Fipronil: Environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. IN: WARE, G.W. (eds) *Reviews of environmental contamination and toxicology*, v. 176. New York: Springer. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7283-5_1

TU, Q.; HICKEY, M.E.; YANG, T.; GAO, S.; ZHANG, Q.; QU, Y.; DU, X.; WANG, J.; HE, L. A simple and rapid method for detecting the pesticide fipronil on egg shells and in liquid eggs by Raman microscopy. *Food Control*, v. 96, p. 16-21, **2019**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.08.025>

VALDES, S.A.C.; VIEIRA, L.G.; FERREIRA, C.H.; MENDONÇA, J.S.; RIBEIRO, P.R.Q.; FERNANDES, E.A.; SANTOS, A.L.Q. Effects of Exposure to Methyl Parathion on Egg Hatchability and Eggshell Chemical Composition in *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae). *Zoological Science*, V. 32, P. 135-140, **2015**. DOI: <https://doi.org/10.2108/zs140164>

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, p. 57-149, **2003**. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)

VOGT, R.C.; FAGUNDES, C.K.; BATAUS, Y.S.L.; BALESTRA, R.A.M.; BATISTA, F.R.W.; UHLIG, V.M.; SILVEIRA, A.L.; BAGER, A.; BATISTELLA, A.M.; SOUZA, F.L.; DRUMMOND, G.M.; REIS, I.J.; BERNHARD, R.; MENDONÇA, S.H.S.T.; LUZ, V.L.F. Avaliação do Risco de Extinção de *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) no Brasil. Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira. 2015. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/estado-de-conservacao/7431-repteis-podocnemis-expansa-tartaruga-da-amazonia2.html>. Acesso em: 30 nov. 2021.

WHO, World Health Organization & International Programme on Chemical Safety. (2010). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009. World Health Organization. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44271>. Acesso em: 22 out. 2021.

YOU DEN, W.J.; STEINER, E.H. *Statistical manual of AOAC – Association of Official Analytical Chemistry*. Washington: AOAC, 1975.

ZHANG, W.; JIANG, F.; OU, J. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, v. 1, p. 125-144, **2011**.