



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



**MARIA FERNANDA MUSSI**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE  
RESÍDUOS DE TIAMETOXAM EM GRÃOS DE FEIJÃO,  
EMPREGANDO EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO À  
BAIXA TEMPERATURA**

**Ituiutaba/MG**

**2023**

**MARIA FERNANDA MUSSI**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE  
TIAMETOXAM EM GRÃOS DE FEIJÃO, EMPREGANDO EXTRAÇÃO SÓLIDO-  
LÍQUIDO COM PARTIÇÃO À BAIXA TEMPERATURA**

Monografia de conclusão de curso apresentada à Comissão Avaliadora como parte das exigências do Curso de Graduação em Química: Bacharelado, do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal da Universidade Federal de Uberlândia.

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

**Ituiutaba/MG**

**2023**

**MARIA FERNANDA MUSSI**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE  
TIAMETOXAM EM GRÃOS DE FEIJÃO, EMPREGANDO EXTRAÇÃO SÓLIDO-  
LÍQUIDO COM PARTIÇÃO À BAIXA TEMPERATURA**

Monografia de conclusão de curso apresentada à Comissão Avaliadora como parte das exigências do Curso de Graduação em Química: Bacharelado, do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal da Universidade Federal de Uberlândia.

**Ituiutaba, 27 de junho de 2023**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Dayane Fonseca Soares (IFTM, *campus* Ituiutaba)**

---

**Prof. Dr. André Luiz dos Santos (ICENP/UFU)**

---

**Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria (ICENP/UFU)**

## DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho à minha família, em especial, aos meus pais, que são meu lar onde quer que eu esteja. Os sinônimos de confiança, incentivo, impulso e ensinamentos. A representação do amar e da liberdade de me permitirem ser e estar, a partir das minhas escolhas e princípios. Dedico, também, ao meu orientador, Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria, essencial para que as minhas escolhas culminassem em aprendizado, leveza e encontro com a área da analítica e demais teorias do curso.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a todas as figuras divinas que me acompanharam durante esses anos de graduação. Cada uma delas representam o amor, o respeito, a aceitação e a estruturação perante cada decisão tomada, como também aquela não tomada.

Aos meus pais, minha irmã, meu sobrinho e meu cunhado, por serem minha fonte de energia a cada retorno para casa, e por me proporcionarem esses retornos. Mãe e pai, obrigada pela oportunidade aos estudos e à consciência que possuo hoje. Para o Kauan do futuro: você aprendeu a ler e, agora, a titia deixa um recado para você – obrigada por nossas brincadeiras aos finais de semana e por despertar em mim os sentimentos mais genuínos em meio à rotina. Obrigada por me ensinar a observar os detalhes. Sua vinda foi, e ainda é, sinônimo de renascimento.

Aos meus tios, em especial: Cristina, Wilson, Marly, Luciano e Jurandir. Obrigada por me auxiliarem durante esses anos, não apenas com bens materiais, mas, principalmente, com palavras, incentivos, conselhos, orientações e orações.

Aos meus avós, Manuela, Antônio, Eulina e Zigomar, por me acompanharem por outra dimensão. Sinto vocês em mim, a partir do amparo espiritual.

Ao Prof. Dr. Anizio, pela paciência e dedicação. Obrigada por transformar cada dúvida em algo tangível, por meio de palavras acessíveis, calmas e empáticas, e por todo conhecimento repassado (e absorvido). Professor, você me inspira, e levarei comigo tudo o que me ensinou (e ensina diariamente).

Aos professores, Prof. Dr. André Luiz dos Santos e Profa. Dra. Dayane Fonseca Soares, por terem aceitado o convite para comporem minha banca para defesa deste Trabalho. Profa. Dayane, desde já agradeço por cada contribuição e pelo olhar externo ao meu trabalho, sendo uma mulher, professora e pesquisadora que tanto trará posições assertivas. Prof. André, obrigada por me inspirar desde o início do curso e por me colocar em lugares de consciência durante as aulas. Obrigada por despertar, em mim, o desejo de conhecer para além das teorias do curso. As conversas, aprendizados e entendimentos serão levados comigo por este caminho. Agradeço aos demais professores do curso de Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia – Campus Pontal.

Ao meu companheiro, Taigor, por estar comigo em todos os momentos, principalmente nesta reta final. Obrigada pela calma, pelas aventuras, pelas visões de mundo e pela possibilidade de sermos, sempre, do nosso jeitinho. Sou muito grata por compartilharmos nossas experiências nas áreas em que nos encontramos durante a graduação.

Ao Allyson, por cada ensinamento e explicação, e também pela paciência e pelos abraços de conforto, em meio aos desesperos dessa reta final. Agradeço à Laís, Maria Clara, Amanda e João Pedro por cada troca. Laís, obrigada pelas ajudas durante o desenvolvimento da minha pesquisa; você foi essencial. Maria Clara, amiga, obrigada por compartilharmos vivências, experiências e o quarto de hotel em Belo Horizonte durante o ERSBQ 2022; você é incrível e imensamente capaz de conquistar as melhores coisas. Tenho muito orgulho de você e de nós duas juntas, por termos superado tantas coisas esse ano. Amanda, minha duplinha e primeira amiga do curso; obrigada por tudo. Você foi essencial para mim durante todos esses anos – saiba que torço muito pela sua felicidade e sucesso, independente do caminho que percorrer. João: Pedro, obrigada por todas as fases móveis filtradas e cada vidraria lavada. Enfim, obrigada por tornar os dias mais leves e por ter dividido tantos momentos comigo, desde as frustrações até as pequenas conquistas do dia a dia.

Às agências de fomento que viabilizaram a realização desta pesquisa: à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa de iniciação científica concedida via PIBIC-UFU; à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pela infraestrutura laboratorial (código: 01.11.0135.00) e equipamentos (código: 01.13.0371.00).

## EPÍGRAFE

*“Somos o que fazemos, mas somos, principalmente,  
o que fazemos para mudar o que somos”*

**Eduardo Galeano**

## RESUMO

A aplicação de agrotóxicos vem sendo evidenciada desde o princípio das grandes culturas, com o intuito de combater pragas e, portanto, conter as doenças nefastas aos plantios. Contudo, o emprego destas substâncias demanda um monitoramento, principalmente nas últimas décadas, em que o uso é considerado exacerbado e feito em larga escala. Considerando os riscos de contaminação dos compartimentos ambientais, como o solo e água, e dos organismos não-alvo, a partir do consumo dos alimentos contaminados com resíduos dos agrotóxicos, neste trabalho, foi desenvolvido um método para determinação do tiametoxam em grãos de feijão, a partir da extração sólido-líquido com partição à baixa temperatura (ESL-PBT). Para a separação e quantificação do agrotóxico, foi empregada a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos. O método ESL-PBT apresenta vantagens, tais como a redução significativa das quantidades de amostra e solventes orgânicos e, ainda, a acessibilidade e simplicidade, o baixo custo, a baixa interferência do analista e a alta eficiência para matrizes complexas. A primeira parte do trabalho consistiu na otimização de alguns parâmetros da ESL-PBT: o solvente extrator; a massa da amostra; a proporção de volumes água:solvente extrator; a quantidade de sal para promover o efeito *salting out*; o tempo de congelamento. O solvente que apresentou melhores percentuais de recuperação foi o acetato de etila, na proporção de água:extrator de 2,0:4,0 (v/v), principalmente após a adição 40 % (m/v) de KCl, empregando massas de 500 mg de feijão e congelamento por 2 h, resultando em taxas de extração próximas a 100 %. Seguida da otimização do método de extração, a etapa da validação foi efetuada, partindo-se dos parâmetros propostos pelo guia de validação da Comunidade Europeia, documento SANTE/11312/2021. Assim, o método proposto foi capaz de extrair, separar e quantificar o tiametoxam em uma amostra complexa como os grãos de feijão, com LOQ equivalente a 0,08 mg kg<sup>-1</sup>, demonstrando boa detectabilidade do método, abaixo do limite máximo de resíduos para o tiametoxam em grãos de feijão.

**Palavras-chave:** ESL-PBT, tiametoxam, grãos de feijão, CLAE-DAD, otimização, validação.

## ABSTRACT

The application of pesticides has been evidenced since the beginning of large crops to combat pests and, therefore, contain harmful diseases to plantations. However, the use of these substances requires monitoring, especially in recent decades, when their use is considered exacerbated and carried out on a large scale. Considering the risks of contamination of environmental compartments, such as soil and water, and non-target organisms, from the consumption of food contaminated with pesticide residues, in this work, we developed a method for the determination of thiamethoxam in bean grains using solid-liquid extraction with a low-temperature partition (SLE-LTP). For the separation and quantification of the insecticide, high-performance liquid chromatography with detection by a diode array was used. The SLE-LTP method has advantages, such as the significant reduction in sample amounts and organic solvents, accessibility and simplicity, low cost, low analyst interference, and high efficiency for complex matrices. Initially, we optimized some SLE-LTP parameters, such as the type of extractor solvent, sample mass, extractor volume, the mass of KCl, and freezing time. The solvent that presented the best percentages of recovery was ethyl acetate, in the proportion of water: extractor of 2.0:4.0 (v/v), mainly after the addition of 40 % (m/v) of KCl, using a mass of 500 mg of beans and freezing for two hours, resulting in extraction rates close to 100 %. Following the optimization of the extraction method, the method validation was carried out based on the parameters proposed by the European Community validation guide, document SANTE/11312/2021. Thus, the proposed method was able to extract, separate and quantify thiamethoxam residues in a complex sample, such as bean grains, with LOQ of 0.08 mg kg<sup>-1</sup>, demonstrating good detectability of the method, below the maximum residue limit for thiamethoxam in bean grains.

**Keywords:** SLE-LTP, thiamethoxam, bean grains, HPLC-DAD, optimization, validation.

## LISTA DE SIGLA E ABREVIATURAS

AChE	Enzima acetilcolinesterase
ACN	Acetonitrila
C18	Octadecilsilano
DAD	<i>Diode array detector</i> – Detector de arranjo de diodos
ESL	Extração sólido-líquido
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> , Organização para a Alimentação e a Agricultura
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
DL	Dose Letal
EM	Efeito Matriz
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> , Cromatografia líquida de alta eficiência
K <sub>H</sub>	Constante da lei de Henry
K <sub>oc</sub>	Coefficiente de adsorção à matéria orgânica do solo
K <sub>ow</sub>	Coefficiente de partição octanol-água
LOD	<i>Limit of detection</i> – limite de detecção
LOQ	<i>Limit of quantification</i> – limite de quantificação
MeOH	Metanol
nAChRs	Receptores nicotínicos de acetilcolina neuronais
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PBT	Partição à baixa temperatura
QuEChERS	<i>Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe</i> , Rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro.
RSD	<i>relative standard deviation</i> – Desvio padrão relativo
SNC	Sistema Nervoso Central
TMX	Tiametoxam

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Classificação dos agrotóxicos, referente à finalidade, de acordo com os organismos controlados. \_\_\_\_\_ 16
- Tabela 2.** Classificação dos agrotóxicos quanto à toxicidade à saúde humana, a depender dos valores de dose letal de metade da população de animais em estudo. \_\_\_\_\_ 18
- Tabela 3.** Características físico-químicas do tiametoxam, de acordo com dados presentes em literatura. \_\_\_\_\_ 19
- Tabela 4.** Variáveis estudadas para a otimização do método ESL-PBT empregado para a extração de tiametoxam de grãos de feijão. \_\_\_\_\_ 32
- Tabela 5.** Matriz do planejamento de experimentos para a avaliação da robustez do método analítico proposto, empregando o teste de Youden. \_\_\_\_\_ 35
- Tabela 6.** Parâmetros analíticos das curvas analíticas obtidas pelos métodos do padrão externo e da calibração na matriz para quantificação de tiametoxam em amostras de grãos de feijão. \_\_\_\_\_ 47
- Tabela 7.** Resultados da precisão, no nível de repetibilidade, do método ESL-PBT para determinação de resíduos de tiametoxam de amostras de grãos de feijão (n = 6). \_\_\_\_\_ 48
- Tabela 8.** Resultados da precisão, no nível de reprodutibilidade intralaboratorial, do método ESL-PBT para determinação de resíduos de tiametoxam de amostras de grãos de feijão (n = 12). \_\_\_\_\_ 49
- Tabela 9.** Taxas de recuperação do tiametoxam nas amostras de grãos de feijão pelo método ESL-PBT. \_\_\_\_\_ 50

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Estrutura química do tiametoxam. _____	21
<b>Figura 2.</b> Mesorregião do Triângulo Mineiro, que compreende a cidade de Ituiutaba/MG, sendo este o local de estudo deste trabalho. _____	22
<b>Figura 3.</b> Área do pico cromatográfico do tiametoxam obtida após extração de amostras de grãos de feijão, empregando diferentes solventes extratores na ESL-PBT (n=3). _____	37
<b>Figura 4.</b> Porcentagens de recuperação de tiametoxam de grãos de feijão, empregando diferentes massas de amostras na ESL-PBT (n=3). _____	38
<b>Figura 5.</b> Porcentagens de recuperação de tiametoxam de grãos de feijão, empregando diferentes volumes de água e acetato de etila na ESL-PBT, com 500 mg de amostra em 4 horas de congelamento (n=3). _____	39
<b>Figura 6.</b> Porcentagens de recuperação de tiametoxam de grãos de feijão, após adição de KCl à água no método ESL-PBT, empregando 500 mg de amostra, 2:4 (v/v) água:solvente extrator, em 4 horas de congelamento (n=3). _____	40
<b>Figura 7.</b> Porcentagens de recuperação de tiametoxam de grãos de feijão pelo método ESL-PBT em função do tempo de congelamento, empregando 500 mg de amostra, 2:4 (v/v) água:solvente extrator e 0,2 g de KCl (n=3). _____	41
<b>Figura 8.</b> Fluxograma geral do método ESL-PBT otimizado para a extração dos resíduos de tiametoxam de grãos de feijão. _____	42
<b>Figura 9.</b> Ilustração do procedimento experimental otimizado da ESL-PBT de resíduos de tiametoxam de grãos de feijão. _____	42
<b>Figura 10.</b> Cromatogramas sobrepostos dos extratos das amostras de grãos de feijão fortificado com tiametoxam e sem fortificação (branco). Condições de análise: FM H <sub>2</sub> O:MeOH (70:30, v/v), vazão 1,0 mL min <sup>-1</sup> ; detecção 254 nm. _____	43
<b>Figura 11.</b> Curva analítica obtida pelo método do padrão externo para o tiametoxam em acetonitrila. _____	44
<b>Figura 12.</b> Cromatograma da solução de tiametoxam a 0,010 mg L <sup>-1</sup> . Condições de análise: FM H <sub>2</sub> O:MeOH (70:30, v/v), vazão 1,0 mL min <sup>-1</sup> ; detecção 254 nm. _____	45
<b>Figura 13.</b> Curvas analíticas para o tiametoxam obtidas pelos métodos do padrão externo e da calibração na matriz. _____	46
<b>Figura 14.</b> Efeito dos sete fatores avaliados, em dois níveis distintos, no estudo de robustez do método, empregando a ESL-PBT para extração de tiametoxam em grãos de feijão. _____	51

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1 Classificações dos agrotóxicos	15
1.1.1 Classificação quanto à finalidade	15
1.1.2 Classificação quanto à origem	16
1.1.3 Classificação quanto à toxicidade à saúde humana	17
1.2 Tiametoxam	18
1.3 Grãos de feijão	21
1.4 Métodos de extração e quantificação de resíduos de tiametoxam de grãos de feijão	23
1.5 Validação do método analítico intralaboratorial	25
1.5.1 Seletividade	25
1.5.2 Linearidade e faixa de trabalho	25
1.5.3 Limite de quantificação	26
1.5.4 Efeito matriz	26
1.5.5 Precisão e exatidão	27
1.5.6 Robustez	28
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
<b>3 METODOLOGIA</b>	<b>30</b>
3.1 Preparo de soluções padrão de tiametoxam	30
3.3 Análise dos extratos por CLAE-DAD	30
3.4 Desenvolvimento e otimização do método ESL-PBT de tiametoxam de grãos de feijão	31
3.5 Validação dos parâmetros analíticos do método desenvolvido	32
3.5.1 Linearidade e faixa de trabalho	32
3.5.1.1 Limite de quantificação	32
3.5.1.2 Sensibilidade	33
3.5.2 Efeito matriz	33
3.5.3 Avaliação da exatidão e precisão do método	33

3.5.4 Teste de Youden para avaliação da Robustez do método	34
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>36</b>
4.1 Otimização do método de extração ESL-PBT	36
4.1.1 Escolha do solvente extrator	36
4.1.2 Escolha da massa de amostra	37
4.1.3 Volumes de água e de solvente extrator	38
4.1.4 Efeito da adição de eletrólito	39
4.1.5 Tempo de congelamento	40
4.2 Validação do método de extração ESL-PBT	43
4.2.1 Seletividade	43
4.2.2 Curva analítica: linearidade e faixa de trabalho	44
4.2.2.1 Limite de quantificação	45
4.2.2.2 Sensibilidade	46
4.2.2.3 Efeito matriz	46
4.2.3 Precisão do método	47
4.2.3.1 Repetibilidade	48
4.2.3.2 Reprodutibilidade intralaboratorial	49
4.2.4 Exatidão do método	50
4.2.5 Estudo da robustez via teste de Youden	51
<b>5 CONCLUSÕES</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>54</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Desde o princípio das culturas, perante os acontecimentos da Revolução Neolítica, são utilizadas substâncias químicas para a contenção e a prevenção de vetores, considerados nefastos aos plantios (GOULART *et al.*, 2022). Na fronteira temporal entre a Antiguidade e a Idade Média, civilizações ocidentais como a grega e a romana empregavam vegetais e compostos simples para o controle dos vetores, sob influência da religiosidade e do exercício do poder, por parte de teóricos e governantes (CARVALHO *et al.*, 2017). Os sumérios, no Oriente, ao decorrer dos anos 2500 a.C., passaram a utilizar pó de enxofre para a contenção de insetos, de forma que o mesmo fosse aplicado ao solo e, logo, conduzido à raiz, especificamente às células (GOULART *et al.*, 2022). No decurso da Idade Média, os chineses passaram a empregar metais pesados, tais como o mercúrio e o arsênio, este fato é conhecido nos dias atuais pelos danos ecológicos causados e à bioacumulação destes metais no decorrer da cadeia alimentar, precisamente, dos níveis tróficos (SOUSA *et al.*, 2021).

Ao longo dos acontecimentos que permeiam e definem a Idade Moderna, o crescimento demográfico incitou a modernização da agricultura, ante o progresso tecnológico e científico. Teorias demográficas, especificamente a Malthusiana, discorriam do axioma de que as populações humanas cresceriam em progressão geométrica, enquanto que a produção de alimentos em progressão aritmética (SILVA *et al.*, 2015). Esta premissa tornou-se inconsistente mediante o aumento dos cultivos otimizados por insumos. Apoiado na óptica socioeconômica, os países emergentes, precisamente, além dos escassos acessos tecnológicos, ainda experienciavam o mínimo acesso à informação. Tal fato atualmente é evidenciado, por exemplo, a partir dos resíduos de agrotóxicos encontrados em alimentos, solo e águas, sendo estas de superfície, subterrâneas, como também, provenientes da chuva, a depender das classificações e das propriedades físico-químicas dos insumos (GOULART *et al.*, 2022).

O conhecimento e o acesso aos preceitos básicos da tecnologia da aplicação, propicia condutas, tais como: a utilização de compostos com menor efeito toxicológico e acúmulo residual; o emprego de equipamentos de proteção individual (EPI's) no decorrer da aplicação; a preservação e calibração dos instrumentos utilizados em pulverizações, anterior à aplicação; a maior importância ao conhecimento da tecnologia da aplicação, para além do produto a ser utilizado, sendo que a espécie-ativa deve ser utilizada em quantidade adequada para atingir, seletivamente, o alvo (BUENO, 2015). Estes procedimentos podem ser responsáveis por evitarem adversidades consequentes das aplicações, por exemplo, relacionadas à toxicidade, lixiviação, volatilização e degradação (BUENO, 2015).

## 1.1 Classificações dos agrotóxicos

Os agrotóxicos são classificados, em geral, segundo as condutas de organizações, como a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, sigla do inglês *Food and Agriculture Organization*), a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) (FRIEDRICH *et al.*, 2021). As subdivisões a serem abordadas neste trabalho tratam-se da finalidade, da origem e da toxicidade à saúde humana (GOULART *et al.*, 2022).

### 1.1.1 Classificação quanto à finalidade

Este segmento diz respeito aos organismos-alvo controlados pelos agrotóxicos, a partir de três maneiras principais de intoxicação: por contato, por ingestão ou por fumigação (NOCELLI *et al.*, 2010). Introduzem-se, neste momento, os fungicidas, herbicidas e inseticidas, vista a considerável atuação destes nos distintos países do globo. Tal fato se deve, principalmente, aos grandes volumes utilizados dos fungicidas, herbicidas e inseticidas, tanto para a preservação da quantidade e qualidade das culturas, quanto para o tratamento fitossanitário, sendo este, no Brasil, determinado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BUENO, 2015). Nesse contexto, o tratamento fitossanitário busca garantir que, durante as transações de exportação e importação, os cultivos e parte deles, como também embalagens e estruturas de madeira, estejam imunes de pragas (MAPA, 2020).

Os fungicidas, que atuam no controle dos fungos, agem a partir da destruição ou inibição do organismo-alvo (PAVANI, 2016). Em relação aos herbicidas, estes influem no controle das plantas invasoras vistas as interferências destas aos demais cultivos, relacionadas à competição e alelopatia (EMBRAPA, 2023). A implicação das ervas daninhas, perante os agroecossistemas, passa a ser considerada competição a partir da redução no montante de recursos disponíveis aos cultivos, a depender da sobreposição das raízes das plantas invasoras às raízes das culturas. Logo, a disponibilidade de água, nutrientes e luz pode ser acometida, além do favorecimento como *habitat* para demais pragas e doenças (RIZZARDI *et al.*, 2001). No que se refere à alelopatia, do grego *allelon* (= de um para o outro) e *pathós* (= sofrer), esta descreve o prejuízo ou favorecimento de um indivíduo a outro, por intermédio de biomoléculas, que são liberadas ao ambiente. Tal processo pode ocorrer a partir do solo ou substrato, em fase aquosa, bem como

por espécies gasosas volatilizadas no ar, nas imediações das embriófitas (FERREIRA; AQUILA, 2000).

Os inseticidas atuam na contenção de insetos em cultivos e podem ser exemplificados a partir da ação do tiametoxam (3-(2-cloro-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-[1,3,5]oxadiazinan-4-ilideno-N-nitroamina) no sistema nervoso dos vetores. Os neonicotinoides, como o tiametoxam, derivados da molécula de nicotina, não são degenerados pela acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável por influenciar nos modos de transmissão de impulsos nervosos, em vertebrados e invertebrados, e degradar moléculas de acetilcolina (SILVA, 2012). Desse modo, o tiametoxam age analogamente à acetilcolina, de forma a manter a ativação contínua deste neurotransmissor, ocasionando transmissões ininterruptas e descontroladas dos impulsos nervosos. Conseqüentemente, este processo pode acarretar colapso do sistema nervoso e morte do inseto (SILVA, 2012).

A Tabela 1 apresenta as demais classificações dos agrotóxicos no que se refere à finalidade, a depender dos organismos que controlam.

*Tabela 1. Classificação dos agrotóxicos, referente à finalidade, de acordo com os organismos controlados.*

<b>Agrotóxicos</b>	<b>Organismo controlado</b>
Acaricidas	Ácaro
Desfolhantes	Plantas indesejadas
Fumigantes	Bactérias no solo
Fungicida	Fungos
Herbicida	Plantas invasoras
Inseticida	Insetos
Raticidas	Roedores
Nematicidas	Nematoides

*Fonte: adaptado de (NOCELLI et al., 2010).*

### **1.1.2 Classificação quanto à origem**

Nesta seção, são envolvidos os agrotóxicos inorgânicos e os orgânicos, sendo estes últimos subdivididos em sintéticos ou naturais. As espécies inorgânicas, exploradas desde os primórdios das culturas, pelas antigas civilizações, passaram a ser notórias comercialmente, e preparadas à base de metais e semimetais, como o mercúrio, cádmio, chumbo, tálio e bário (SOUSA *et al.*, 2021). Em vista disso, tornou-se evidente a persistência e alta toxicidade dos compostos, além da bioacumulação no decorrer dos níveis tróficos, sendo este processo

viabilizado pelas grandes dosagens necessárias para tornar o agrotóxico de origem inorgânica eficiente. Já as espécies orgânicas passaram a pertencer a uma categoria de suma importância, principalmente no que tange às experimentações relacionadas aos compostos sintéticos, e seus problemas toxicológicos, por exemplo, os clorados, fosforados e nitrogenados, visto o avanço da síntese orgânica (NOCELLI *et al.*, 2010).

Os compostos orgânicos naturais podem ser explicitados por aqueles derivados da piretrina, sabadina, rutenona e nicotina, com aplicação ainda incipiente (NOCELLI *et al.*, 2010). O grupo químico dos neonicotinoides, cuja terminologia do termo compreende a nicotina e demais inseticidas semelhantes conformacional e estruturalmente, trata-se de um novo conjunto de inseticidas que atuam no sistema nervoso central (SNC) dos insetos, conforme citado anteriormente. Esta atuação ocorre a partir de interações com os receptores nicotínicos de acetilcolina neuronais (nAChRs) (FERREIRA *et al.*, 2022). Estes receptores referem-se a canais iônicos da membrana plasmática, situados no SNC. Logo, a partir da ação de moléculas endógenas, como o neurotransmissor acetilcolina, e de moléculas exógenas, como a nicotina, os canais se abrem e propiciam a passagem de cátions (BATISTA, 2016).

Atualmente, os inseticidas neonicotinoides, a exemplo do tiametoxam, são bastante utilizados em cultivos vegetais, como feijões, cereais, tabaco, algodão e batata, em virtude da eficácia na contenção tanto de insetos que se nutrem da seiva, como as cigarrinhas, quanto de insetos que trituram tecidos vegetais, por exemplo, os besouros (BATISTA, 2016).

### **1.1.3 Classificação quanto à toxicidade à saúde humana**

Mediante o processo de registro dos agrotóxicos, agências reguladoras propõem a categorização dos mesmos em quatro Classes Toxicológicas, em função dos impactos à saúde humana, quando exposta a estes agentes, a depender da Dose Letal 50 % (DL<sub>50</sub>). Este parâmetro estatístico é estabelecido a partir da quantidade necessária de um tóxico para eliminar 50 % de uma população de animais durante ensaios toxicológicos; para os agrotóxicos, empregam-se os parâmetros DL<sub>50</sub> oral e DL<sub>50</sub> dérmico, sendo este último atribuído a roedores, quando testados (GARCIA *et al.*, 2005). Nesse contexto, a toxicidade é expressa em miligramas do produto tóxico, suficientes para eliminar 50 % do animal em ensaio por quilogramas de peso vivo (NOCELLI *et al.*, 2010). Diante disso, quanto menor o valor de DL<sub>50</sub> maior a toxicidade do composto à saúde humana, visto que mínimas quantidades prontamente tornam-se capazes de extinguir 50 % da população de animais em estudo. A Tabela 2 apresenta as respectivas classes

toxicológicas e suas descrições quanto à toxicidade, em função dos valores de  $DL_{50}$ , sendo estas representadas pelas diferentes colorações das faixas presentes no rótulo do produto.

Tabela 2. Classificação dos agrotóxicos quanto à toxicidade à saúde humana, a depender dos valores de dose letal de metade da população de animais em estudo.

Classe Toxicológica	Toxicidade	$DL_{50}$	Faixa colorida
I	Extremamente tóxico	$\leq 5 \text{ mg Kg}^{-1}$	Vermelha
II	Altamente tóxico	Entre 5 e 50 $\text{mg Kg}^{-1}$	Amarela
III	Medianamente tóxico	Entre 50 e 500 $\text{mg Kg}^{-1}$	Azul
IV	Pouco tóxico	Entre 500 e 5000 $\text{mg Kg}^{-1}$	Verde

Fonte: adaptado de (NOCELLI *et al.*, 2010).

## 1.2 Tiametoxam

Os inseticidas do grupo químico derivado da nicotina, os neonicotinoides, são ativos contra insetos que mastigam e sugam a seiva dos cultivos. Dentre estas pragas, incluem-se os pulgões (*Aphidoidea*), as moscas-brancas (*Bemisia tabaci*), as cigarrinhas-do-milho (*Dalbulus maidis*), os tripses (*Thysanoptera*), os besouros (*Coleoptera*), bem como algumas espécies da ordem dos lepidópteros (*Lepidoptera*) (NOCELLI *et al.*, 2010). O tiametoxam, um inseticida sistêmico e objeto de estudo deste trabalho, foi considerado eficiente para o controle de tripses e demais insetos da ordem Hemiptera, como as moscas-brancas e as cigarrinhas, substituindo-se os carbamatos e fosforados, os quais perderam a eficiência perante a resistência de insetos (SUKEANE *et al.*, 2013). Diante disso, o tiametoxam apresenta classificação toxicológica III e, portanto, medianamente tóxico. Ademais, o agrotóxico demonstra atividade para o tratamento de solos, folhas e sementes, conforme presente em literatura (SUKEANE *et al.*, 2013). A partir disso, remete-se às características físico-químicas do tiametoxam perante as três repartições da biosfera: a atmosfera, a hidrosfera e a litosfera. Dentre as propriedades, aborda-se a volatilidade, o coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo ( $K_{oc}$ ), o coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ), a solubilidade em água e, por fim, os valores máximos permitidos de agrotóxicos em água (GOULART *et al.*, 2022).

A Tabela 3 descreve estas características físico-químicas do tiametoxam de forma quantitativa, conforme os valores presentes em literatura, os quais podem ser associados ao comportamento do composto cuja análise é descrita por este trabalho.

Tabela 3. Características físico-químicas do tiametoxam, de acordo com dados presentes em literatura.

Propriedades físico-químicas	Valores
Pressão de vapor (mm Hg)	$4,95 \times 10^{-11}$
Constante de Henry ( $\text{atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$ )	$4,64 \times 10^{-15}$
$K_{oc}$	32 a 70
Log $K_{ow}$ a 25 °C	-0,13
Solubilidade em água a 25 °C ( $\text{g L}^{-1}$ )	4,1

Fonte: adaptado de (HILTON et al., 2016).

A volatilidade é relacionada à distribuição das moléculas do agrotóxico pelo ambiente, a depender dos modos de aplicação, os quais podem acarretar o desperdício do produto. Devido a isso, como também a demais problemas associados, torna-se importante o conhecimento da volatilidade dos agrotóxicos a partir da pressão de vapor e da constante da lei de Henry ( $K_H$ ) (GOULART *et al.*, 2022). A pressão de vapor é manifestada pela força atuante no equilíbrio entre uma fase aquosa e outra gasosa em um sistema, após a influência da significativa energia de determinadas moléculas presentes no meio (ATKINS *et al.*, 2018). Em relação aos agrotóxicos, a pressão de vapor remete-se à volatilização do composto puro e, mediante possíveis modificações na conformação molecular das substâncias torna-se necessário conceituar a constante da lei de Henry (OLIVEIRA; BRIGHENTI, 2011). Esta quantifica a tendência das moléculas de um agrotóxico em se transferirem da solução para a atmosfera, como gás ou vapor, potencializando-se os riscos de problemas ambientais. Por exemplo, a partir do alcance dos resíduos de agrotóxicos a espécies não-alvo, como também às águas de abastecimento e organismos humanos (HANSON *et al.*, 2016).

Tal fato pode ser relacionado ao modo de aplicação do tiametoxam por meio da pulverização sobre as folhas, sendo estudados, portanto, outros dois modos alternativos: a incorporação ao solo e o tratamento de sementes. Na incorporação ao solo, o inseticida é adicionado diretamente ao solo, que ao entrar em contato com as raízes, é transportado junto aos nutrientes para as extremidades da planta, distribuindo-os nas folhas, grãos e caule. O mecanismo pode ocorrer para o agrotóxico, com o objetivo de que se aloje nas folhas para o controle das espécies-alvo. Evita-se, assim, a concentração nos grãos, no solo e nas águas, como também os possíveis danos à saúde humana e às demais espécies do ecossistema (SANTOS, 2018).

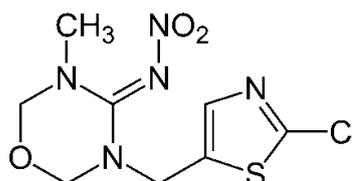
Conforme exposto na Tabela 3, o tiametoxam apresenta pressão de vapor equivalente a  $4,95 \times 10^{-11}$  mm Hg e constante de Henry de  $4,64 \times 10^{-15}$  atm m<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>. Tais dados referem-se a um composto de baixa volatilidade a não volátil, visto que a pressão de vapor se encontra abaixo da ordem  $10^{-8}$  e  $K_H$  inferior a  $10^{-7}$ , sendo características de espécies pouco voláteis, conforme a literatura (GOULART *et al.*, 2022). Nota-se, portanto, a proporcionalidade existente entre os valores de P e  $K_H$  em relação à volatilidade; menor o valor, menor a inclinação dos agrotóxicos em se volatilizarem para a atmosfera.

A adsorção é um fenômeno físico-químico, em que um composto em fase gasosa ou líquida, como os agrotóxicos, é deslocado para a superfície de uma fase sólida. Nesse sentido, o coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo ( $K_{oc}$ ) é a capacidade de uma substância em se adsorver à fase sólida do solo por meio da presença de matéria orgânica. Desse modo, quanto maior o valor de  $K_{oc}$  maior é a afinidade das moléculas do agrotóxico pela matéria orgânica do solo, então, maior a tendência em serem adsorvidas (OLIVEIRA; BRIGHENTI, 2011). Por outro lado, o menor o valor de  $K_{oc}$  confere maior afinidade à solução aquosa presente no solo e, assim, maior a solubilidade do agrotóxico em água. O tiametoxam apresenta  $K_{oc}$  na faixa de 32 a 70, de acordo com a Tabela 3, dentro do intervalo classificatório de 0,5 a 99 que, segundo a literatura (GEBLER; SPADOTTO, 2004), indica uma baixa adsorção à matéria orgânica. Logo, pode-se considerar uma tendência do tiametoxam de se lixiviar e escoar superficialmente incorrendo na contaminação das águas subterrâneas e de superfície (OLIVEIRA; BRIGHENTI, 2011). Ademais, o valor baixo de  $K_{oc}$  apontado pode influir na degradação do tiametoxam no ambiente, uma vez que os componentes do solo, durante o processo de adsorção, envolvem as moléculas contra a luz do sol e ação de microrganismos (GOULART *et al.*, 2022).

Em relação à maior afinidade do agrotóxico pela solução aquosa do solo, introduz-se o coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ), também expresso como LogP, que se refere ao grau de lipofilicidade ou hidrofiliicidade de um composto. De acordo com a Tabela 3, o tiametoxam apresenta Log  $K_{ow}$ , a 25 °C, de -0,13 e  $K_{ow}$  de 0,74, o que confirma a afinidade da espécie para soluções aquosas, corroborando com o valor de  $K_{oc}$ . Em vista disso, considera-se menor a bioconcentração das moléculas do tiametoxam aos tecidos adiposos de organismos vivos e, conseqüentemente, menor a bioacumulação nos níveis tróficos da cadeia alimentar. Contudo, estas moléculas, devido à afinidade com soluções aquosas, deslocam-se facilmente pelos compartimentos ambientais, contribuindo para suas contaminações (DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2014).

A estrutura química do tiametoxam é apresentada na Figura 1 a fim de se relacionarem as forças intermoleculares da espécie provavelmente estabelecidas com a matriz da amostra e com os solventes testados para o desenvolvimento da metodologia química proposta neste trabalho.

Figura 1. Estrutura química do tiametoxam.



Fonte: Própria autora.

### 1.3 Grãos de feijão

A princípio, o feijão rajado, *Phaseolus vulgaris*, é considerado a leguminosa de grande importância e consumo, principalmente para a população de territórios da América Latina, Índia e África (BRIGIDE, 2002). Isto porque a alimentação e os costumes são relacionados com um conjunto de fatores como a cultura, o contexto histórico, o clima e o solo, o que influencia diretamente na propensão de certos alimentos diários. Nesse sentido, compreende-se o alimento sob uma óptica social e cultural, constituindo-se conexões com quem come, com o que se produz e com demais fatores que contornam o ato de se alimentar e tecer vínculos sociais (LIMA *et al.*, 2015).

No Brasil, a produção de feijão é vista como uma significativa fonte de proteína vegetal à população, em especial por assistir às refeições dos diferentes estratos sociais. Tal fato é considerado, principalmente no contexto em que as dietas apoiadas na proteína animal geram impactos no orçamento de grande parte das famílias brasileiras (CARBONELL *et al.*, 2021). A produção ocorre em diferentes safras, sendo estas em até três vezes ao ano, a depender das condições, especificamente, climáticas dos estados brasileiros (SILVEIRA, 2022). Em vista disso, o estado de Goiás e a região do Triângulo Mineiro, esta última demarcada pela Figura 2 e região de execução desta pesquisa, apresentam uma tendência de produzir feijão nas três safras anuais citadas anteriormente, sendo esta capacidade influenciada pelas condições do Cerrado mineiro e pelas características físicas do latossolo vermelho da região (SILVEIRA, 2015). Esta categoria de solo tropical decorre em regiões de relevo plano e pouco ondulado, favorecendo a automatização agrícola e o cultivo de grãos.

Figura 2. Mesorregião do Triângulo Mineiro, que compreende a cidade de Ituiutaba/MG, sendo este o local de estudo deste trabalho.



Fonte: adaptado de (CASTANHO; SOUTO, 2013).

Ademais, dentre as características físicas e químicas dos grãos de feijão, ressalta-se a absorção de água antes e após o cozimento dos grãos; os pigmentos, que são localizados na capa externa da semente, denominada tegumento; a quantidade de fibras, minerais, proteínas e vitaminas, principalmente as hidrossolúveis, como a vitamina B6, a tiamina e o ácido fólico. Ainda referente à composição dos grãos, o amido é considerado o componente essencial, compreendendo a faixa de 60 a 65 % da composição total. Em relação à análise sensorial, consideram-se as possíveis reações químicas que podem afetar o grão, por exemplo no que tange à coloração do mesmo. Essas reações químicas são enzimáticas ou não enzimáticas, sendo estas últimas caracterizadas pela reação de Maillard, resultante do aquecimento da combinação entre aminoácidos e carboidratos (EMBRAPA, 2021).

Além dos aspectos já mencionados, realiza-se, neste momento, uma abordagem a respeito das pragas do feijoeiro, uma vez que o estudo e o controle destas proporcionam, também, melhores colheitas dos grãos de feijão (CASTELLANOS *et al.*, 2017). Primeiramente, essas pragas são insetos que atacam o cultivo de acordo com o ciclo da planta, sendo este vegetativo ou reprodutivo e, além disso, são classificados em insetos de solo, das folhas e das vagens. Destaca-se a cigarrinha-verde (*Empoasca kraemeri*), a mosca-branca (*Bemisia tabaci* Biótipo B) e as vaquinhas (*Ceratomyxa arcuata*), vista a relação destas com o presente trabalho, sendo a ocorrência, em grande parte, nas regiões quentes e secas, como as citadas. A cigarrinha-verde ataca a folha a partir de ação toxicogênica, o que impede o desenvolvimento da planta. O controle químico desse inseto ocorre a partir dos inseticidas organofosforados, carbamatos ou

neonicotinoides (COSTA *et al.*, 2010). Em relação às características da mosca-branca, o adulto deposita ovos na seção inferior da folha, além de sugar a seiva e, conseqüentemente, injetar toxinas no processo, propiciando o prateamento das folhas. O controle é indicado até o estágio de florescimento, sendo que o químico decorre por meio do tratamento das sementes com neonicotinoides, fosforados, bem como com a pulverização com neonicotinoides (SILVA *et al.*, 2006). Por fim, as vaquinhas são responsáveis pela destruição das folhas e o manejo químico provém dos neonicotinoides, betaciflutrina, acefato, fenitrothion, dentre outros, pulverizados (CASTELLANOS *et al.*, 2017).

Nesse trabalho, aborda-se a aplicação do tiametoxam ao solo, uma vez que a pulverização apresenta grandes indícios de contaminação a diferentes cultivos, para além da cultura do feijão em questão. O método de pulverização aérea apresenta ineficiência e altas perdas, sendo o uso justificado por fundamentos econômicos em oposição à racionalidade técnica (BUENO, 2015). Neste sentido, objetiva-se uma aplicação gradativa e que, a partir do controle dos insetos-alvo, o tiametoxam seja totalmente degenerado na planta, sem deslocação para os grãos. Portanto, neste trabalho, buscou-se desenvolver um método eficaz para a determinação do teor de tiametoxam nos grãos de feijão e avaliar a eficiência da aplicação do tiametoxam no tratamento do feijoeiro e o risco de contaminação do alimento.

#### **1.4 Métodos de extração e quantificação de resíduos de tiametoxam de grãos de feijão**

A preparação da amostra consiste na etapa entre a amostragem e a análise instrumental, a fim de que esta pequena população representativa do todo seja convertida do estado natural para uma porção adequada à medida analítica. Nesse sentido, o preparo da amostra pode envolver o isolamento do composto alvo da matriz da amostra; a concentração do analito diluído, principalmente em amostras ambientais, dentro dos limites de quantificação da técnica; a eliminação de espécies interferentes ao sinal do analito; e, em algumas situações, a conversão do analito a outra forma química, de forma que seja viável à análise quantitativa (COLLINS *et al.*, 2006).

Neste trabalho, buscou-se otimizar o método de extração sólido-líquido com partição à baixa temperatura (ESL-PBT), que apresenta vantagens tais como o baixo custo, a acessibilidade e simplicidade, a baixa interferência do analista e a alta eficiência para matrizes complexas. A ESL-PBT fundamenta-se em colocar a amostra sólida em contato com pequenos volumes de solvente extrator, sendo este miscível em meio aquoso e menos denso que a água, que também deve ser adicionada à mistura, caso não esteja presente (CAMPOS, 2021).

Portanto, a ESL-PBT pode ser diferenciada do método tradicional de extração sólido-líquido em relação ao uso de solventes imiscíveis à água, normalmente, solventes clorados tóxicos e em grandes volumes. Além disso, a ESL-PBT mudou a estratégia de como o analito se particiona de um meio para outro, devido à mobilidade das moléculas em meio líquido. Na PBT, as moléculas dos analitos, para não perderem a mobilidade, tendem a migrar para a fase orgânica extratora durante a etapa de congelamento da fase aquosa na ESL-PBT, uma vez que esta permanece líquida. Ademais, um solvente extrator efetivo deve apresentar temperatura de fusão inferior a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e menor densidade que a água (CAMPOS, 2021). A partir disso, a mistura é agitada e mantida em *freezer* por um determinado período, objetivando-se o congelamento da fase sólida da amostra em meio à água, na parte inferior, enquanto os analitos particionam para o solvente extrator que permanecerá líquido. Logo, o extrato sobrenadante é separado e filtrado antes da análise em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (AMBROSIO, 2022).

Por fim, nota-se a necessidade de uma extensa superfície de contato entre a amostra e o solvente extrator, para uma maior mobilidade do analito para a fase orgânica e, portanto, uma extração mais eficiente. Isto pode ser propiciado pela redução das partículas da amostra sólida e também pela agitação da mistura composta pela amostra, água e solvente extrator. Outra forma de aumentar a taxa de transferência do analito de uma fase para outra é a adição de sais totalmente solúveis na fase aquosa, resultando no chamado efeito *salting out*. O efeito *salting out* refere-se à ruptura das forças de solvatação da fase aquosa ante as moléculas do analito, propiciando-se a diminuição da solubilidade da espécie orgânica na matriz aquosa (HYDE *et al.*, 2017). Isto ocorre porque o efeito do sal adicionado compete com o eletrólito existente na solução, bem como do analito orgânico e da interação do mesmo com o solvente extrator (BARROS, 2014).

Em relação à quantificação do analito no extrato, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) se destaca como a principal técnica analítica para análise de resíduos de agrotóxicos (COLLINS *et al.*, 2006). A principal vantagem da CLAE frente a outras técnicas analíticas capazes de quantificar os resíduos de agrotóxicos é a sua capacidade de realizar a separação destes compostos de coextrativos da matriz, que não foram eliminados totalmente durante o preparo da amostra. Além disso, a CLAE possibilita a determinação simultânea de um número significativo de resíduos de agrotóxicos de baixa volatilidade, instáveis termicamente, com características desde altamente polares até totalmente hidrofóbicos em tempos relativamente curtos (NASIRI *et al.*, 2020).

Desta forma, neste trabalho buscou-se desenvolver uma metodologia para determinação dos resíduos de tiametoxam de grãos de feijão empregando a extração sólido-líquido com

partição à baixa temperatura (ESL-PBT) e a quantificação dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD).

## **1.5 Validação do método analítico intralaboratorial**

A partir do desenvolvimento de uma metodologia para a preparação da amostra e a quantificação do analito por uma técnica instrumental apropriada, deve-se validar o método a fim de analisá-lo quanto à conformidade com o objetivo pretendido. Nesse sentido, a validação deve (i) garantir a qualidade e compatibilidade dos resultados analíticos, com precisão aceitável e (ii) assegurar que falsos positivos ou falsos negativos sejam evitados (WHO, 2017). Atualmente, considera-se o SANTE/11312/2021 como o guia de validação com referência na validação de métodos para determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes de alimentos e rações (SANTE, 2022). Esse documento, elaborado pela Comunidade Europeia, atenta-se para a segurança dos alimentos, apoiado no monitoramento dos níveis máximos de resíduos e da exposição do consumidor (WHO, 2017). Em relação aos métodos cromatográficos, os parâmetros analíticos, também denominados figuras de mérito, comumente estabelecidos e analisados na validação, como também nesse trabalho, são: linearidade, faixa dinâmica de trabalho (faixa linear), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), sensibilidade, efeito matriz, precisão, exatidão e robustez (AMBROSIO *et al.*, 2022).

### **1.5.1 Seletividade**

Refere-se à capacidade do método em determinar o analito em meio à matriz de estudo, ainda que esta contenha demais componentes com características similares às da espécie de interesse. A seletividade pode ser avaliada de forma qualitativa, a partir da comparação dos cromatogramas da amostra isenta do analito e fortificada com um padrão do analito.

### **1.5.2 Linearidade e faixa de trabalho**

A linearidade se refere à capacidade do método em fornecer resultados, referentes ao sinal analítico, diretamente proporcionais à concentração da espécie de interesse. Esta dependência pode ser observada a partir da curva analítica, sendo representada por uma reta com relação  $y = ax + b$ , em que  $y$  e  $x$  correspondem ao sinal analítico e à concentração do analito, respectivamente. Os coeficientes, angular ( $a$ ) e linear ( $b$ ), são estabelecidos pela

regressão linear em que, a partir dos dados experimentais, institui-se um modelo matemático que explica o comportamento dos dados experimentais (ARAGÃO *et al.*, 2009). Este comportamento segue uma tendência, sendo descrita pelo coeficiente de correlação linear ( $r$ ), o qual, quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão entre os resultados experimentais e o modelo definido pela regressão linear.

A faixa de trabalho corresponde à faixa de concentrações em que o analito deve ser encontrado na amostra e é representada pelo intervalo de concentrações da curva analítica (SILVA; FARIA, 2020). A concentração mais baixa desse intervalo deve ser, portanto, a menor concentração capaz de ser quantificada, com exatidão e precisão, pelo método, ou seja, aquela correspondente ao limite de quantificação do método.

### ***1.5.3 Limite de quantificação***

A menor concentração que o analito pode ser quantificado pelo método, com precisão e exatidão aceitável, é definida como o limite de quantificação (LOQ, *limit of quantification*). Já o limite de detecção, este condiz à menor concentração da espécie de interesse, cuja área do pico pode ser detectada pelo equipamento. Observa-se que a concentração mais baixa a ser detectada não necessariamente é a menor a ser quantificada, vista a falta de precisão e exatidão aceitáveis. O LOQ pode ser determinado a partir da visualização do menor sinal repetível do analito no cromatograma e, portanto, a menor concentração, por meio da injeção consecutiva de padrões do analito, do mais concentrado ao mais diluído.

### ***1.5.4 Efeito matriz***

O efeito matriz se refere à interferência no sinal analítico do composto de interesse na análise de substâncias que constituem a matriz da amostra. Como efeito líquido pode-se observar a diminuição ou aumento do sinal do analito. Visualmente, comparam-se as inclinações da reta da curva analítica para o analito em solvente puro (método do padrão externo) e da reta da curva analítica para o analito no extrato da matriz (método da calibração na matriz) (SANTE, 2022). Quantitativamente, o efeito matriz pode ser calculado a partir da Equação 1.

$$EM (\%) = \frac{S_{matriz} - S_{solvente}}{S_{solvente}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Em que:  $S_{matriz}$  é o coeficiente angular da equação da curva analítica na matriz e  $S_{solvente}$  é o coeficiente angular da equação da curva analítica preparada em solvente.

### 1.5.5 Precisão e exatidão

A precisão de um método mede o grau de dispersão dos resultados de ensaios experimentais repetidos realizados sob condições semelhantes e definidas, empregando-se o método analítico sob avaliação. A precisão pode ser expressa a partir de duas dimensões: repetibilidade e precisão intermediária, também denominada reprodutibilidade intralaboratorial. Para a determinação da repetibilidade, as análises devem ser feitas em ao menos seis replicatas sob dois níveis de concentração do analito, próximos ao LOQ, a fim de se avaliar a concordância entre os resultados obtidos pelo método. Além disso, as análises são realizadas sob as mesmas condições em um curto intervalo de tempo, empregando o mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento, mesmo laboratório e mesmo lote de reagentes. Já na determinação da precisão intermediária ou reprodutibilidade intralaboratorial, deve-se também realizar os ensaios em pelo menos seis replicatas sob dois níveis de concentração próximos do LOQ, variando-se uma ou mais condições experimentais dentro do laboratório: dia de execução do método, analistas, instrumentos, lotes de reagentes etc. (SANTE 2022).

Para expressar os resultados da precisão de um método pode-se empregar o desvio padrão absoluto(s) ou o desvio padrão relativo (RSD, *relative standard deviation*), conforme Equações 2 e 3, respectivamente.

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{Equação 2}$$

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Um método analítico é considerado preciso, em termos de repetibilidade e de reprodutibilidade interlaboratorial quando o RSD é menor que 20 % (SANTE, 2022).

A exatidão refere-se à comparação dos resultados obtidos pelo método sob avaliação com um valor de referência, aceito como verdadeiro. O valor de referência pode ser baseado no resultado obtido da análise de um material de referência certificado (MRC), empregando o

método proposto; pelo resultado da análise de uma amostra, empregando um método oficial ou um método já publicado na literatura para a mesma finalidade; ou a partir de ensaios de adição e recuperação do analito das amostras, empregando o método proposto (SANTE, 2022). Devido a inexistência de MRC para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos e de métodos oficiais para análise de resíduos para a maioria dos agrotóxicos, normalmente se emprega os ensaios de adição e recuperação para avaliação da exatidão de um método analítico. Os ensaios de adição e recuperação são baseados na fortificação da amostra isenta do agrotóxico com quantidades conhecidas do analito. Em seguida, submete-se a amostra fortificada ao método proposto e determina-se a taxa de recuperação do analito adicionado inicialmente. A taxa de recuperação de um analito pode ser determinada pela Equação 4.

$$R(\%) = \frac{[\text{agrotóxico}]_{\text{extraído}}}{[\text{agrotóxico}]_{\text{fortificado}}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Como critério de aceitação para um método analítico de boa exatidão é considerada uma taxa de recuperação que compreende a faixa de 70 a 120 % de extração do analito da amostra (SANTE, 2022).

### **1.5.6 Robustez**

A robustez é a capacidade do método em mostrar quanto o sinal do analito varia mediante pequenas variações, não controladas, nas condições experimentais em que o método será empregado. Estas variações podem ser decorrentes da falta de condições de um laboratório para reproduzir de forma idêntica o método proposto, seja pela troca de lote ou de marca de um reagente etc. Para avaliar a robustez de um método analítico, Youden e Steiner (1975) propuseram um estudo baseado em um planejamento experimental a partir de poucos ensaios verificando um grande número de variáveis que podem afetar a resposta do método. O teste de Youden descreve um planejamento fatorial fracionário  $2^{7-4}$  que permite a avaliação do efeito de sete variáveis do método, associadas tanto à etapa de preparação de amostra quando à etapa de quantificação do analito, realizando oito ensaios experimentais.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo central deste trabalho foi desenvolver, otimizar e validar uma metodologia para a determinação de tiametoxam em grãos de feijão, empregando a extração sólido-líquido com partição à baixa temperatura, e análises dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos.

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

- ✓ Desenvolver um método de análise por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificar os resíduos de tiametoxam sem interferência de componentes da matriz da amostra;
- ✓ Desenvolver e otimizar um método ESL-PBT para a extração dos resíduos de tiametoxam de grãos de feijão;
- ✓ Validar o método de determinação de tiametoxam de grãos de feijão, de acordo com o guia de validação de métodos analíticos proposto pela Comunidade Europeia (documento SANTE/11312/2021).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Preparo de soluções padrão de tiametoxam

O tiametoxam utilizado neste trabalho apresenta grau de pureza analítico com 99 % de pureza mínima, sendo obtido da empresa Sigma-Aldrich. A princípio, foi preparada uma solução estoque de tiametoxam com concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup>, sendo pesada, em balança analítica de 0,0001 g, uma massa de 0,0100 g do padrão. Esta foi dissolvida em 10 mL de acetonitrila grau HPLC. A partir dessa solução, a qual foi armazenada em *freezer* a -4 °C, prepararam-se 10 mL de uma solução de trabalho com concentração 100 mg L<sup>-1</sup>. A partir da diluição desta solução de trabalho as demais soluções de tiametoxam foram preparadas aos níveis requeridos em cada etapa do estudo desenvolvido.

#### 3.2 Processamento das amostras de grãos de feijão

Para o desenvolvimento, otimização e validação do método foi utilizada uma amostra de grãos de feijão isentas de agrotóxicos, produzida no Instituto Federal do Triângulo Mineiro, *campus* Ituiutaba e fornecida pelo Prof. Dr. Júlio César Devaulx. Os grãos de feijão foram processados, em um miniprocessador Mondial Premium MP01, até a obtenção de partículas finamente divididas e totalmente homogêneas dos grãos. Este processamento foi realizado visando aumentar a superfície de contato da amostra com o solvente extrator durante a etapa da preparação da amostra.

#### 3.3 Análise dos extratos por CLAE-DAD

O método analítico presente neste trabalho foi desenvolvido em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência da Waters®, com sistema quaternário de bombeamento e2695, equipado com detector por arranjo de diodos modelo 2998 PDA. O tratamento e processamento dos dados de análise foi realizado pelo software Empower3®, a partir das interações sucedidas na fase estacionária da coluna de aço inox de 150 mm × 4,6 mm d.i. recheada com partículas de 3,5 µm XSelect C<sub>18</sub> HSS (marca Waters). Em relação à fase móvel, esta foi composta por H<sub>2</sub>O:MeOH (70:30; v:v), no modo de eluição isocrático, sendo a água ultrapurificada com resistividade superior a 18,2 MΩ cm em purificador Master System MS200 (Gehaka, São Paulo, Brasil). Tanto a água quanto o metanol, sendo este de grau cromatográfico com 99,5 %

de pureza, foram filtrados separadamente em sistema composto por funil de placa sinterizada; membrana de *nylon* com porosidade 0,22  $\mu\text{m}$  e diâmetro de 45 mm; kitassato 500 mL; bomba de vácuo. Por conseguinte, a fase móvel filtrada foi colocada em banho ultrassônico por 15 minutos, para remoção de demais contaminantes e gases presentes na superfície dos líquidos, impedindo-se a formação de bolhas no sistema cromatográfico.

A análise foi realizada com detecção ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm, comprimento de onda de máxima absorção do tiametoxam, conforme visto em literatura, sendo registrados o tempo de retenção do analito e o tempo total da análise.

### **3.4 Desenvolvimento e otimização do método ESL-PBT de tiametoxam de grãos de feijão**

O método selecionado nesse trabalho foi a extração sólido-líquido com partição à baixa temperatura, objetivando-se a máxima recuperação dos resíduos de tiametoxam, dentro do critério de aceitação do documento SANTE/11312/2021 (SANTE, 2021), sem interferência de demais espécies ao sinal do analito.

Desse modo, a extração do tiametoxam dos grãos de feijão, a partir do método ESL-PBT, envolveu a pesagem da massa (250; 5000 ou 1000 mg) da amostra previamente processada de grãos de feijão em um tubo Falcon®, a qual estava fortificada com 500  $\mu\text{L}$  da solução de tiametoxam a 100  $\text{mg L}^{-1}$ . Manteve-se o contato entre a amostra e o agrotóxico, à temperatura ambiente, por 5 min e, após isso, foi acrescentado um volume (2,0; 3,0 ou 4,0 mL) de água ultrapura ao tubo Falcon®. O contato entre a amostra e a água foi também realizado à temperatura ambiente por 2 min e, em seguida, adicionou-se uma massa (0,200 ou 0,400 g) de KCl à água. Posteriormente, foi adicionado o solvente extrator (metanol; acetona ou acetato de etila), em volumes de 4,0; 6,0 ou 8,0 mL, aos grãos de feijão contaminados. Assim, sucedeu-se a agitação do tubo em Vórtex, por 1 min, seguida pela agitação em centrífuga, por 3 min, a 3000 rpm. O tubo contendo a mistura foi levado para congelamento em *freezer*, a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante um período de tempo (2; 4 ou 6 h). Por fim, do extrato, com o auxílio de uma seringa, foi retirada uma alíquota de 1 mL do sobrenadante, o qual corresponde à fase orgânica não congelada, em que se espera obter o tiametoxam. A porção foi, então, filtrada em filtro Millex® (Millipore) e colocada em *vial*, para posterior análise cromatográfica.

Os experimentos foram realizados de forma independente, de acordo com a ordem cronológica em que se sucederam: estudo do solvente extrator; da massa da amostra; dos volumes de água e solvente; da massa de sal adicionado; por fim, do tempo de congelamento, seguindo um estudo univariado. As variáveis estudadas são sumarizadas na Tabela 4.

Tabela 4. Variáveis estudadas para a otimização do método ESL-PBT empregado para a extração de tiametoxam de grãos de feijão.

Massa amostra (mg)	Volume água (mL)	Massa KCl (g)	Solvente extrator	Volume solvente (mL)	Tempo congelamento (h)
250	2	0,200	Metanol	4,0	2,0
500	3	0,400	Acetona	6,0	4,0
1000	4	-	Acetato de etila	8,0	6,0

Fonte: Própria autora.

### 3.5 Validação dos parâmetros analíticos do método desenvolvido

Neste trabalho, o protocolo definido para a validação do método desenvolvido 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/11312/2021 (SANTE, 2022). Os parâmetros analíticos validados foram: limite de quantificação (LOQ), linearidade, faixa dinâmica de trabalho (faixa linear), sensibilidade, efeito matriz, precisão, exatidão e robustez.

#### 3.5.1 Linearidade e faixa de trabalho

A linearidade foi obtida a partir do registro da área do pico do tiametoxam em função das concentrações dos padrões do agrotóxico (0,01; 0,10; 0,25; 0,50; 1,0 mg L<sup>-1</sup>) analisadas por CLAE-DAD nas condições de análise otimizadas. A concentração mais baixa da curva consistiu no limite de quantificação do instrumento. A partir disso, pode-se confirmar a veracidade da regressão linear por meio do coeficiente de regressão linear (r) maior que 0,99, e, portanto, menor a dispersão entre os pontos experimentais, os quais seguem uma tendência. Em relação à faixa de trabalho, esta foi definida a partir da curva linear obtida no estudo da linearidade.

##### 3.5.1.1 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi determinado após injetar duas vezes cada solução padrão do tiametoxam, que apresentava as respectivas concentrações: 1,0; 0,5; 0,25; 0,10; 0,05; 0,01; 0,005 mg L<sup>-1</sup>. Esperou-se obter um sinal repetitivo entre ambas as injeções, com variação da área de pico inferior a 20 %, no que se diz respeito ao desvio padrão relativo. As soluções foram injetadas no sistema cromatográfico da mais concentrada à mais diluída, até o desaparecimento

do sinal do pico do agrotóxico no cromatograma. Logo, o LOQ refere-se à menor concentração em que o instrumento é capaz de realizar o registro do sinal do analito, de forma repetitiva e confiável. Ademais, para ser considerado o limite de quantificação do instrumento, a solução na concentração do LOQ foi injetada 5 vezes e calculado o RSD das concentrações. Avaliou-se a capacidade das injeções em serem quantificadas com precisão e, logo, com RSD menor que 20 %.

### *3.5.1.2 Sensibilidade*

A sensibilidade do método, para o tiametoxam, foi determinada diretamente na curva analítica, a partir da inclinação da mesma. A inclinação de uma curva analítica é estabelecida pelo coeficiente angular da equação da reta, que relaciona o aumento do sinal em função do aumento da concentração do analito.

### *3.5.2 Efeito matriz*

No contexto da recuperação do tiametoxam da amostra, a interferência de espécies presentes na composição dos grãos de feijão foi estudada a partir do efeito matriz. Logo, compararam-se as curvas analíticas para os padrões do agrotóxico, sendo uma preparada em acetonitrila e a outra preparada no extrato da matriz dos grãos de feijão, sob as condições experimentais otimizadas. Este trata-se de um estudo qualitativo, na qual se determina a existência de efeito matriz no método a partir da comparação das inclinações das curvas analíticas preparadas em solvente e no extrato da matriz. Quantitativamente, o efeito matriz foi calculado pela Equação 1.

### *3.5.3 Avaliação da exatidão e precisão do método*

A precisão e a exatidão foram avaliadas em duas concentrações diferentes, conforme sugerido pelo documento SANTE/11312/2021 (SANTE, 2022) e, além disso, dentro da faixa de 1-10× o limite de quantificação do método, empregando ensaios de adição e recuperação. Neste trabalho, realizaram-se o estudo nas concentrações de 5×LOQ e 10×LOQ, em sextuplica (6×) para cada nível testado. As medidas de precisão foram avaliadas em duas dimensões: (i) repetibilidade – seis extrações, para cada nível de fortificação da amostra de grão de feijão, realizadas sob as mesmas condições otimizadas e em um mesmo dia; e (ii) reprodutibilidade

intralaboratorial (precisão intermediária) – seis extrações da amostra de grão de feijão, sendo esta fortificada em dois níveis de concentração, realizadas em dias distintos por analistas diferentes, empregando-se o método ESL-PBT otimizado. Em ambas as dimensões da precisão, o desvio padrão relativo foi medido para avaliar o grau de repetibilidade e de reprodutibilidade intralaboratorial do método proposto. De acordo com o guia SANTE/11312/2021 (SANTE, 2022), o critério de aceitação para que um método analítico seja considerado preciso é de RSD < 20 %.

Em relação à exatidão do método proposto para a determinação de tiametoxam em grãos de feijão, esta foi medida através das taxas de recuperação obtidas dos ensaios de adição e recuperação nos dois níveis de concentração, 5×LOQ e 10×LOQ, submetidas ao método ESL-PBT otimizado. O critério de aceitação para que um método analítico seja considerado exato, de acordo com o documento SANTE/11312/2021 (SANTE, 2022), deve apresentar taxa de recuperação do composto compreenda a faixa 70 a 120 %.

#### ***3.5.4 Teste de Youden para avaliação da Robustez do método***

A robustez do método, para a determinação dos resíduos de tiametoxam em grãos de feijão, foi avaliada empregando-se o teste de Youden (YOU DEN; STEINER, 1975). Este teste permite determinar os fatores que possuem a maior influência sobre a resposta de um método analítico 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 determinação da robustez, pelo teste de Youden, foram realizadas 8 extrações de tiametoxam de amostras de grãos de feijão fortificadas, avaliando-se 7 fatores simultaneamente a partir de um planejamento fatorial fracionário  $2^{7-4}$  (BARROS NETO *et al.*, 2010). Os experimentos realizados consistiram na fortificação dos grãos de feijão com concentração de 10×LOQ para o tiametoxam, seguida da aplicação do método ESL-PBT otimizado e análise dos extratos por CLAE-DAD nas condições otimizadas. Os fatores e os respectivos níveis avaliados, para o estudo da robustez do método, são apresentados na Tabela 5. As letras em maiúsculo referem-se aos valores originais do método otimizado e as letras em minúsculo se referem aos valores deliberadamente variados no método otimizado.

Tabela 5. Matriz do planejamento de experimentos para a avaliação da robustez do método analítico proposto, empregando o teste de Youden.

Fatores	Experimentos								Condições	
	1	2	3	4	5	6	7	8	Otimizadas	Alteradas
Volume de solvente (mL)	A	A	A	A	a	a	a	a	4,0	4,5
Tempo de congelamento (h)	B	B	b	b	B	B	b	b	2,0	2,5
Massa de amostra (mg)	C	c	C	c	C	c	C	c	500	525
Acetonitrila (marca)	D	D	d	d	d	d	D	D	Êxodo	Tedia
Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	E	e	E	e	e	E	e	E	1,0	0,9
FM (% ACN)	F	f	f	F	F	f	f	F	10	12
Temperatura (°C)	G	g	g	G	g	G	G	g	30	32

Fonte: Própria autora.

A avaliação da robustez do método foi realizada a partir do cálculo dos efeitos para cada fator variado nas condições experimentais. O método proposto é considerado robusto quando a resposta das variações deliberadas, para cada fator estudado, é inferior a 20 % da porcentagem de recuperação da variação nominal. Os efeitos encontrados para cada fator foram referentes as porcentagens de recuperação, obtidos de acordo com os experimentos realizados pelo teste de Youden da Tabela 5, calculados através da Equação 5.

$$\text{Efeito } (A - a) = \bar{R}_A - \bar{R}_a \quad \text{Equação 5}$$

Em que:  $\bar{R}_A$  é a resposta média para os experimentos realizados sob condições otimizadas e  $\bar{R}_a$  é a resposta medida para os experimentos realizados sob condições alteradas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Otimização do método de extração ESL-PBT

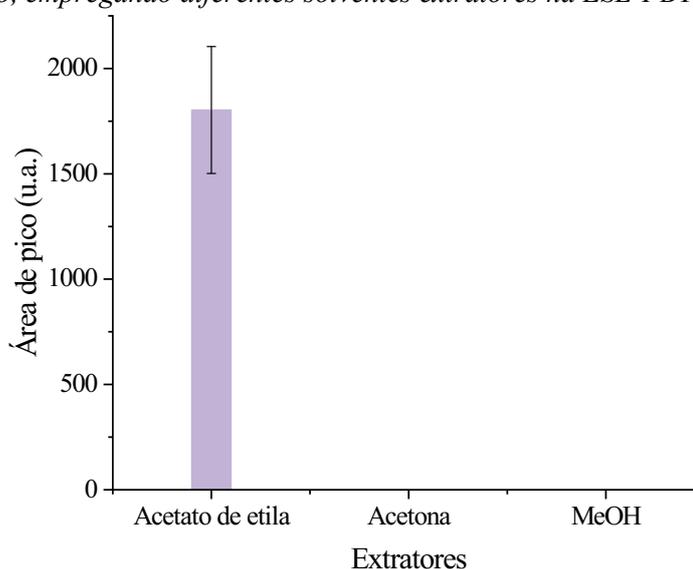
A escolha de um método para a preparação da amostra tem exigido cada vez mais procedimentos que sejam rápidos, menos laboriosos (número mínimo de etapas), que consumam pouco ou nenhum reagente químico e baixos volumes de solventes orgânicos e, que tenham pouca intervenção do analista. A ESL-PBT se enquadra nestes parâmetros, principalmente em comparação a métodos recomendados para extração de resíduos de agrotóxicos em alimentos, como o método QuEChERS. O método QuEChERS, que apresenta consideráveis aplicações na literatura, é caracterizado por variadas etapas como as de agitação e de centrifugação e o uso de diversos insumos químicos. Logo, evidencia-se o maior envolvimento do analista no processo, podendo levar a maior propagação de erros na sua execução (KIM *et al.*, 2019). Além das vantagens da ESL-PBT, esta apresenta resultados consideráveis na extração de agrotóxicos em matrizes sólidas. No entanto, para cada matriz a ser estudada o método ESL-PBT deve ser ajustado em suas condições de execução para resultar em processo eficiente de extração do analito, livre de potenciais interferentes presentes na matriz da amostra. Desta forma, a ESL-PBT de resíduos de agrotóxicos de amostras de grãos de feijão foi otimizada para extração eficiente do inseticida.

#### 4.1.1 Escolha do solvente extrator

Para a otimização do método de extração ESL-PBT, inicialmente foram avaliados os solventes mais frequentemente empregados para a extração de resíduos de agrotóxicos e outros compostos em matrizes alimentícias ou não (KIM *et al.*, 2019; PRESTES *et al.*, 2009). Nesse sentido, os solventes estudados nesse trabalho foram o acetato de etila, a acetona e o metanol, traçando-se uma comparação quanto às porcentagens de recuperação do tiametoxam, após a fortificação da amostra com solução padrão do inseticida. Foram fixadas a massa da amostra em 1000 mg, os volumes de água e de solvente em 2,0 e 4,0 mL, respectivamente, e o tempo de congelamento em 4 h. No entanto, só foi possível recuperar uma fração muito baixa de tiametoxam, menos de 10 %, quando empregado o acetato de etila sob essas condições, Figura 3. Com o uso do metanol e da acetona não foi possível identificar o pico do tiametoxam nos cromatogramas. Utilizando-se a acetona, evidenciou-se que o solvente absorve no mesmo comprimento de onda em estudo, visto o pico pronunciado, o que pode ter mascarado o pico do

tiametoxam. Em relação ao metanol, não houve congelamento nos tempos de 4 e 6 horas, inviabilizando o uso do solvente mediante a característica desejável para o método: menor tempo de extração e de análise. Desta forma, foi fixado o acetato de etila para os estudos posteriores, na expectativa de ajustar as demais condições e favorecer a extração mais efetiva do inseticida. De acordo com López-Ruiz e colaboradores (2022), o acetato de etila possui características compatíveis com diferentes classes de compostos e, por isso, apresenta eficiência na extração simultânea de agrotóxicos de diferentes características químicas presentes em diferentes tipos de amostras (LÓPEZ-RUIZ *et al.*, 2022).

Figura 3. Área do pico cromatográfico do tiametoxam obtida após extração de amostras de grãos de feijão, empregando diferentes solventes extratores na ESL-PBT (n=3).



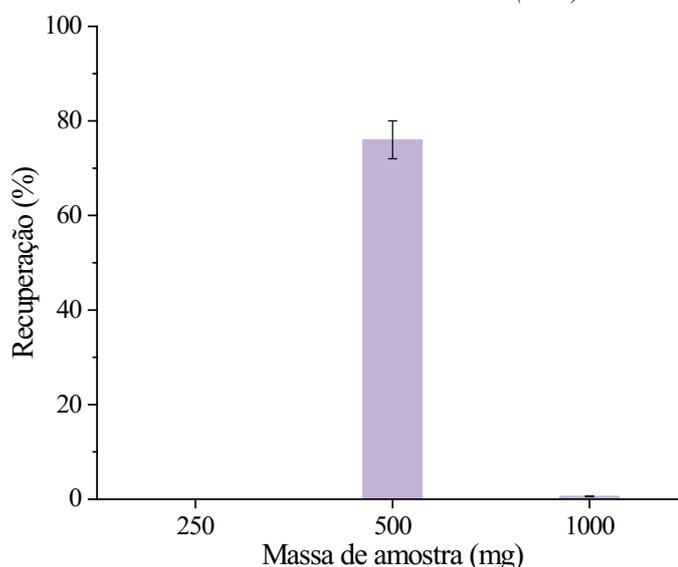
Uma possível explicação para a baixa extração do tiametoxam e apenas por um dos solventes empregados é a quantidade de massa de amostra empregada em relação aos volumes inicial de água e solventes extratores. Devido à dificuldade de separação de fases observada experimentalmente, os volumes empregados podem ter sido insuficientes para garantir a separação de fases e o particionamento do tiametoxam das amostras. Assim, como era desejável trabalhar com baixos volumes de solventes, buscou-se avaliar o tamanho da amostra a ser empregada no processo ESL-PBT.

#### 4.1.2 Escolha da massa de amostra

A massa de grãos de feijão é uma variável de fundamental importância no método de extração ESL-PBT, pois dimensiona todo o procedimento para a extração eficiente do

tiametoxam, quanto ao volume de água a ser adicionado, o volume de solvente extrator e o tempo necessário para o contato entre esses solventes e a amostra. As massas de amostra estudadas foram 250, 500 e 1000 mg, empregando o acetato de etila como solvente extrator e as demais condições previamente informadas. As massas de 500 e 1000 mg foram as únicas que possibilitaram a recuperação do tiametoxam inicialmente adicionado às amostras. Sendo que a massa de 500 mg possibilitou a recuperação de  $76,0 \pm 4,0$  % de tiametoxam das amostras, empregando o acetato de etila como extrator (Figura 4). A massa de 1000 mg de grãos de feijão resultou em valor inferior a 10 % de extração do tiametoxam. Para a condição de 250 mg de amostra, não se observou o pico do tiametoxam nos cromatogramas dos extratos e, assim, não foi possível registrar a extração do tiametoxam. Esses resultados indicam que a massa da amostra apresenta uma influência significativa no processo operacional da extração sólido-líquido com partição à baixa temperatura. Amostras sólidas muito grandes requerem volumes maiores de solventes para a separação de fases durante a etapa de congelamento, enquanto amostras sólidas pequenas apresentam dificuldade de se decantar e assim congelar juntamente à fase aquosa durante a etapa de congelamento. Logo, a massa de 500 mg de amostra foi definida como a quantidade a ser empregada no método ESL-PBT.

Figura 4. Porcentagens de recuperação de tiametoxam de grãos de feijão, empregando diferentes massas de amostras na ESL-PBT (n=3).

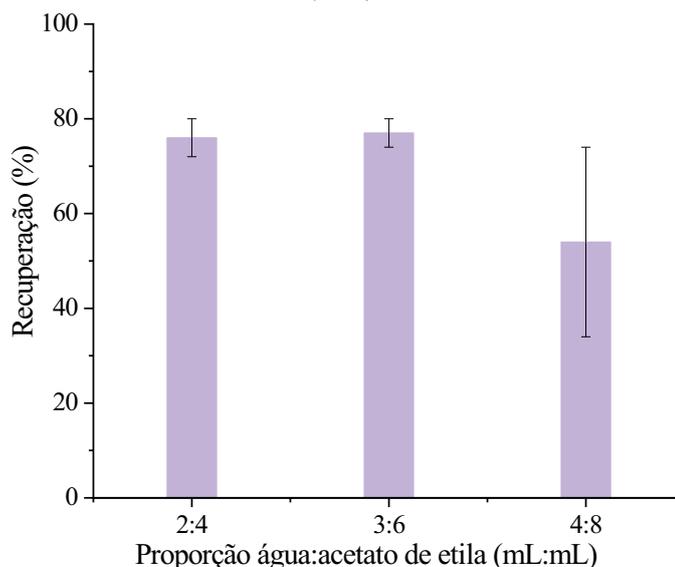


#### 4.1.3 Volumes de água e de solvente extrator

Os volumes de água e de solvente extrator para a melhor extração de tiametoxam de grãos de feijão pelo método ESL-PBT foram avaliados fixando-se a proporção água:extrator de

1:2 (v/v). Deste modo, as proporções água:acetato de etila estudadas foram 2,0:4,0; 3,0:6,0 e 4,0:8,0 mL, empregando uma massa de amostra de 500 mg. As recuperações obtidas para o tiametoxam em função dos volumes de água e acetato de etila, empregando o método ESL-PBT, estão apresentadas na Figura 5.

Figura 5. Porcentagens de recuperação de tiametoxam de grãos de feijão, empregando diferentes volumes de água e acetato de etila na ESL-PBT, com 500 mg de amostra em 4 horas de congelamento ( $n=3$ ).



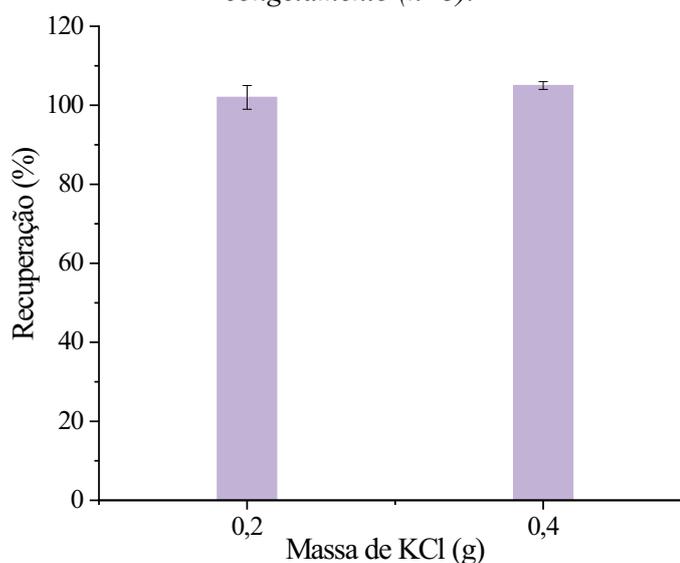
Como pode ser observado na Figura 5, a proporção água:solvente 3,0:6,0 mL apresentou porcentagem de extração de  $77 \pm 3\%$ , estatisticamente igual à recuperação de  $76 \pm 4\%$  referente à proporção de 2,0:4,0 mL. Assim, optou-se pela proporção de 2,0 mL de água para 4,0 mL de acetato de etila, visto que o menor volume de solvente orgânico condiz com as características desejáveis para a ESL-PBT que visa métodos mais limpos e que gerem menor volume de resíduos.

#### 4.1.4 Efeito da adição de eletrólito

O tiametoxam apresenta coeficiente de partição octanol-água ( $\log K_{ow}$ ) baixo, equivalente a 0,74, nesse sentido, o composto possui maior afinidade pela água, dificultando-se a partição para a fase orgânica. Assim, estudou-se o aumento da eficiência da extração a partir da adição de sal à amostra para promover o efeito *salting out*. Neste processo, os íons resultantes da dissociação do sal atraem as moléculas de água que solvatam o analito na amostra, disponibilizando a molécula do analito para ser particionada para o solvente extrator

(PRESTES *et al.*, 2009). Portanto, a solvatação das moléculas do agrotóxico diminui, propiciando-se a movimentação do tiametoxam para a fase extratora de acetato de etila (AGUIAR JÚNIOR *et al.*, 2018). Para tal efeito, foi avaliada a adição de 0,2 g (20 %, m/v) e de 0,4 g (40 %, m/v) de KCl nos 2 mL de água. As recuperações obtidas para o tiametoxam, de acordo com as concentrações de KCl adicionadas, estão apresentadas na Figura 6.

Figura 6. Porcentagens de recuperação de tiametoxam de grãos de feijão, após adição de KCl à água no método ESL-PBT, empregando 500 mg de amostra, 2:4 (v/v) água:solvente extrator, em 4 horas de congelamento (n=3).



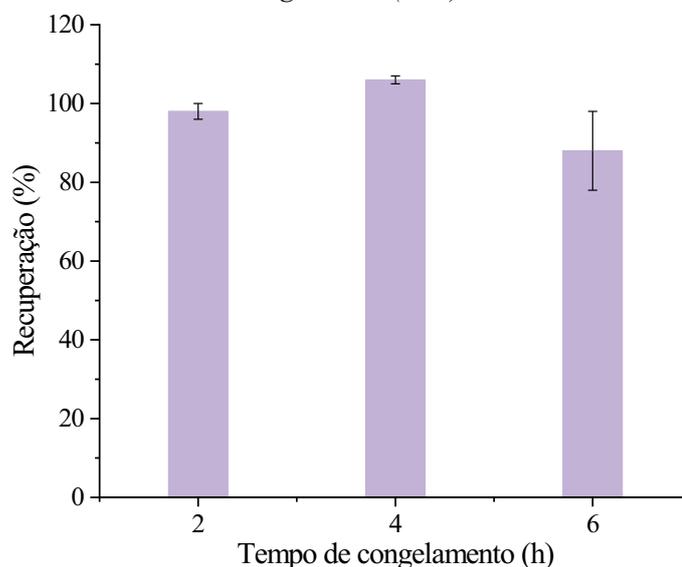
De acordo com os resultados da Figura 6, a adição de KCl a 40 % (m/v) proporcionou uma recuperação de  $106 \pm 1$  % do tiametoxam das amostras de grãos de feijão, enquanto a adição de sal a 20 % (m/v) promoveu uma recuperação de  $101 \pm 3$  %. Assim, optou-se pela adição de 0,4 g de KCl à água no processo de ESL-PBT de tiametoxam de amostras de grão de feijão. É importante mencionar que este efeito é observado em outras aplicações em que o método ESL-PBT foi empregado para extração de resíduos de agrotóxicos de amostras alimentícias e as taxas de recuperação foram aumentadas com a adição de sal (DUFOUR *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2021).

#### 4.1.5 Tempo de congelamento

A adição de sal no processo de extração provoca a variação das posições de equilíbrio sólido-líquido que podem afetar a partição à baixa temperatura na extração sólido-líquido (ATKINS, 2011). Assim, foi avaliado o tempo de congelamento da amostra após a adição do

sal. As recuperações obtidas para o tiametoxam, de acordo com o tempo de congelamento, estão apresentadas na Figura 7.

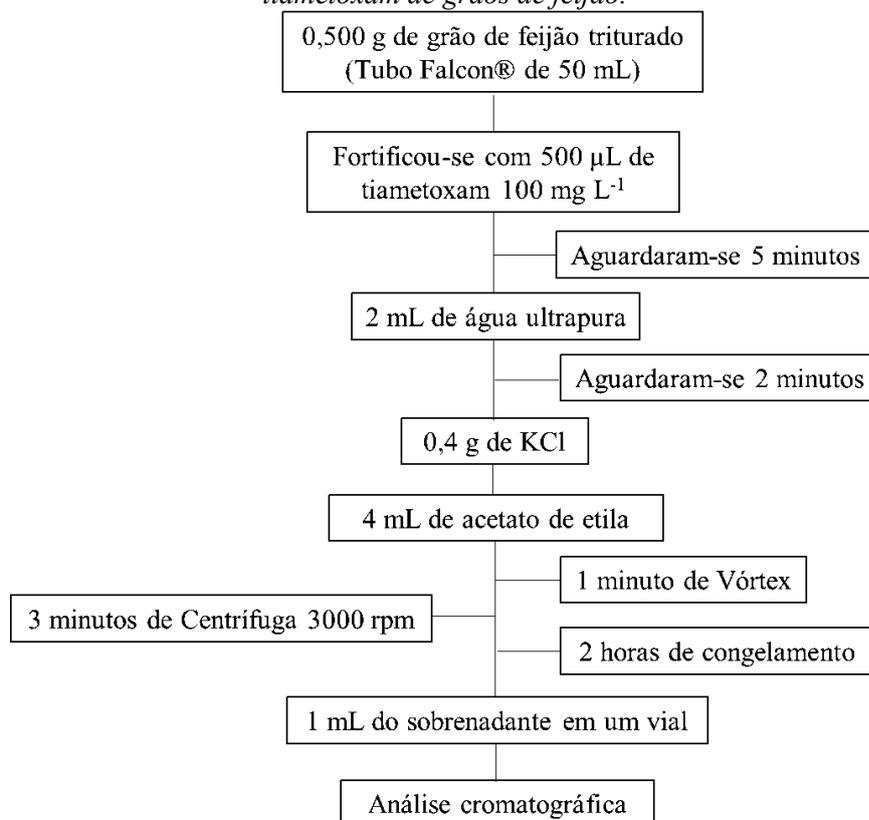
*Figura 7. Porcentagens de recuperação de tiametoxam de grãos de feijão pelo método ESL-PBT em função do tempo de congelamento, empregando 500 mg de amostra, 2:4 (v/v) água:solvente extrator e 0,2 g de KCl (n=3).*



A maior porcentagem de recuperação do tiametoxam remete-se ao tempo de congelamento de 4 horas, resultando em  $106 \pm 1$  % conforme apresentado na Figura 7. Contudo, para o tempo de 2 horas, apesar de menor taxa de extração se comparado a 4 horas, o método mostrou-se eficiente, como já esperado a partir da adição do sal, com percentual de  $98 \pm 2$  %. O maior tempo de congelamento resulta em um maior tempo de contato do analito particionado para o solvente orgânico com a fase aquosa congelada, o que minimizou a porcentagem de recuperação do tiametoxam. Provavelmente, parte do analito foi adsorvido na camada sólida congelada em contato com solvente extrator, reduzindo o teor de tiametoxam no extrato. Como uma das características desejáveis do método ESL-PBT é o tempo de execução reduzido, foi definido o tempo de 2 h, como a condição otimizada para a partição a baixa temperatura.

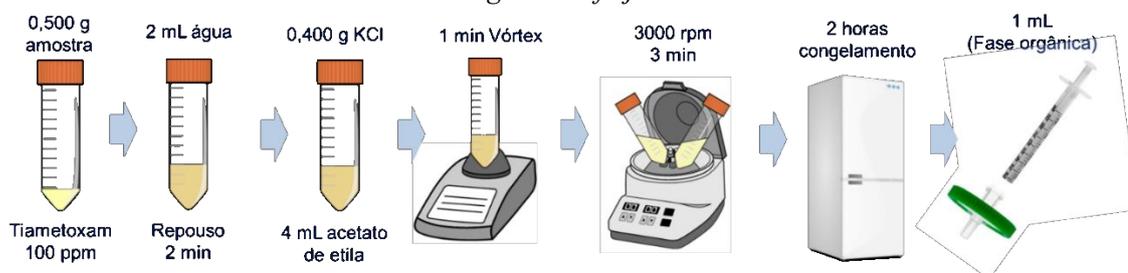
Após todas as condições otimizadas para a ESL-PBT de tiametoxam de grãos de feijão, o procedimento otimizado do método na forma de fluxograma é apresentado na Figura 8.

Figura 8. Fluxograma geral do método ESL-PBT otimizado para a extração dos resíduos de tiametoxam de grãos de feijão.



Para uma melhor visualização da simplicidade do processo de extração desenvolvido, um esquema experimental é apresentado na Figura 9. Nesta ilustração é possível observar que a atuação da analista é reduzida e o número de etapas simplificado, quando comparado com outros métodos que vêm sendo aplicados nos últimos 10 anos para extração de resíduos de agrotóxicos de alimentos (ZHANG *et al.*, 2012).

Figura 9. Ilustração do procedimento experimental otimizado da ESL-PBT de resíduos de tiametoxam de grãos de feijão.



Fonte: Própria autora.

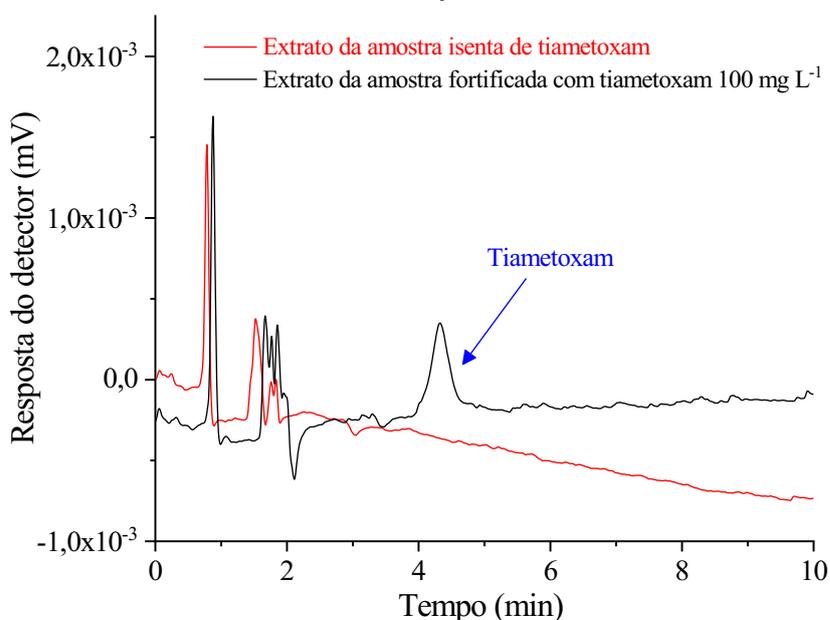
## 4.2 Validação do método de extração ESL-PBT

A validação de um método analítico ocorre a partir de avaliações de parâmetros, conhecidos como figuras de méritos, realizadas em laboratório. A partir disso, indica-se que o método atende às normas estabelecidas por agências reguladoras e órgãos de fiscalização nacionais e/ou internacionais. Nesse trabalho, foi empregado o guia de validação elaborado pela Comunidade Europeia, o documento SANTE/11312/2021 (SANTE, 2022), avaliando-se os parâmetros analíticos: seletividade, LOQ, linearidade e faixa de trabalho, precisão, exatidão e robustez.

### 4.2.1 Seletividade

A seletividade do método para a determinação de tiametoxam em grãos de feijão foi avaliada pela sobreposição dos cromatogramas, conforme mostra a Figura 10, obtidos na análise do extrato fortificado com padrão de tiametoxam e da amostra isenta do agrotóxico (branco) sob condições otimizadas da ESL-PBT.

Figura 10. Cromatogramas sobrepostos dos extratos das amostras de grãos de feijão fortificado com tiametoxam e sem fortificação (branco). Condições de análise: FM H<sub>2</sub>O:MeOH (70:30, v/v), vazão 1,0 mL min<sup>-1</sup>; detecção 254 nm.



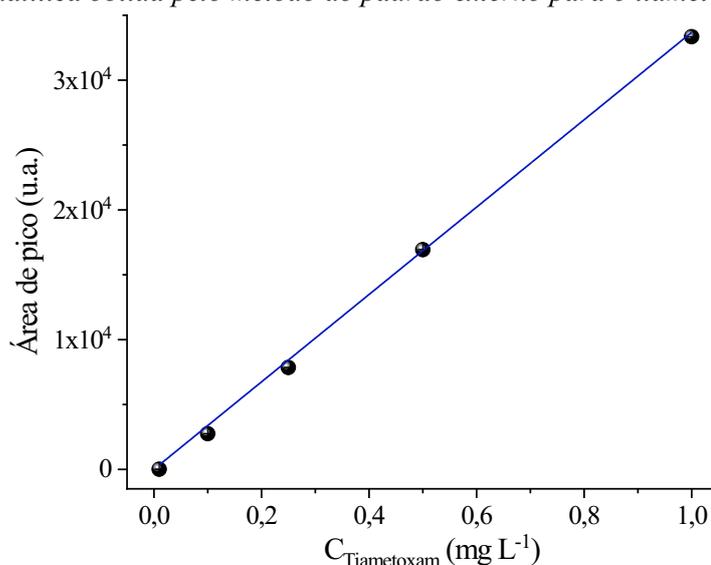
A partir da Figura 10, observa-se que o tiametoxam é eluído como um pico isolado no cromatograma, sem a interferência de componentes da matriz dos grãos de feijão. Nesse

sentido, como descrito pelo guia SANTE/11312/2021, a seletividade do método é efetiva quando a resposta do analito não é afetada pelo sinal de coextrativos da matriz da amostra ou quando o efeito de coextrativos mediante o sinal do analito é inferior a 30 % da área total do pico do analito (SANTE, 2022). Assim, considera-se o método seletivo para a determinação de tiametoxam em amostras de feijão.

#### 4.2.2 Curva analítica: linearidade e faixa de trabalho

Para avaliar a linearidade do método otimizado foi construída uma curva analítica com cinco concentrações distintas, sendo a menor concentração definida pelo limite de quantificação do método. A Figura 11 apresenta a curva analítica obtida para o tiametoxam, a partir do método do padrão externo, empregando a acetonitrila como solvente.

Figura 11. Curva analítica obtida pelo método do padrão externo para o tiametoxam em acetonitrila.



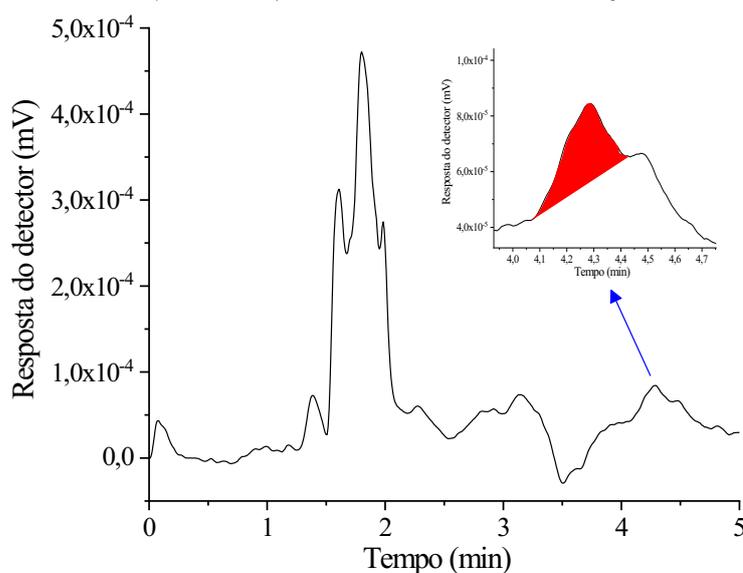
A faixa de concentrações do tiametoxam estabelecida como faixa de trabalho do método foi de 0,010 mg L<sup>-1</sup> a 1,00 mg L<sup>-1</sup>. Nota-se que esta faixa de concentrações apresenta relação linear com o sinal analítico para o tiametoxam, Figura 11, resultando em coeficientes de regressão linear ( $r$ ) e de determinação ( $R^2$ ), obtidos pelo método dos mínimos quadrados, de 0,99937 e 0,99873, respectivamente. Estes valores são superiores a 0,99, que é o critério de aceitação apresentado no documento SANTE/11312/2021 para a linearidade do método. Dessa maneira, o modelo linear obtido para o tiametoxam, na amostra de grão de feijão, encontra-se

devidamente ajustado e pode ser empregado para a determinação da concentração de tiametoxam, dentro da faixa de trabalho, a partir das medidas cromatográficas.

#### 4.2.2.1 Limite de quantificação

O limite de quantificação do instrumento foi avaliado após a injeção consecutiva dos padrões do tiametoxam, preparados em solvente, em concentrações decrescentes do inseticida. As injeções ocorreram da solução mais concentrada à mais diluída, até o menor sinal antes do desaparecimento do pico do agrotóxico no cromatograma. Na Figura 12 é apresentado o cromatograma referente à menor concentração de tiametoxam capaz de ser registrada como pico no cromatograma.

Figura 12. Cromatograma da solução de tiametoxam a  $0,010 \text{ mg L}^{-1}$ . Condições de análise: FM  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$  (70:30, v/v), vazão  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; detecção  $254 \text{ nm}$ .



É possível observar na Figura 12 que o limite de quantificação do tiametoxam foi medido e definido como  $0,010 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo a menor concentração registrada como pico no estudo da linearidade do método. Além disso, a partir das cinco injeções da concentração de  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  de tiametoxam, observou-se uma variação da área do pico equivalente a 10 % e, portanto, menor que os 20 % recomendados pelo Documento SANTE/11312/2021 (SANTE, 2022). Considerando a massa de amostra utilizada e o volume de solvente do extrato, essa concentração corresponde a  $0,08 \text{ mg kg}^{-1}$  de tiametoxam na amostra de feijão. Esse valor é inferior aos  $0,30 \text{ mg kg}^{-1}$  definidos como o limite máximo de resíduos de tiametoxam no feijão de acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2019).

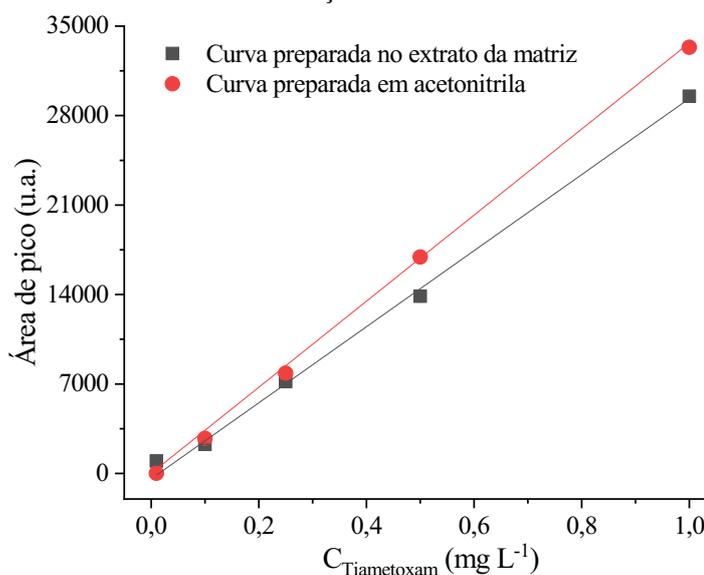
#### 4.2.2.2 Sensibilidade

A sensibilidade do método equivale à inclinação da curva analítica preparada no solvente, apresentada na Figura 11 e, portanto, a  $33673,3 \text{ L mg}^{-1}$ . Logo, apesar da inexistência de um método oficial para a comparação e, assim, a conclusão relativa à sensibilidade do método em questão, pode-se evidenciar uma discriminação adequada da resposta do analito frente a pequenas mudanças na concentração do tiametoxam.

#### 4.2.2.3 Efeito matriz

Devido à complexidade da matriz de grãos de feijão, um possível efeito matriz no método analítico desenvolvido foi avaliado a partir da comparação das curvas analíticas preparadas com padrões de tiametoxam preparados em acetonitrila e preparados no extrato da matriz da amostra (calibração na matriz). As curvas analíticas foram plotadas e comparadas quanto às inclinações, como preconizado pelo documento SANTE/11312/2021 (SANTE, 2022). Nesta análise qualitativa, a não sobreposição das duas retas indica a ocorrência de efeito matriz no método, ou seja, a influência de componentes da matriz na resposta do analito. A Figura 13 apresenta as curvas analíticas preparadas em solvente e na matriz para avaliação do efeito matriz.

Figura 13. Curvas analíticas para o tiametoxam obtidas pelos métodos do padrão externo e da calibração na matriz.



Os parâmetros analíticos das curvas de calibração preparadas em solvente e no extrato da matriz são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros analíticos das curvas analíticas obtidas pelos métodos do padrão externo e da calibração na matriz para quantificação de tiametoxam em amostras de grãos de feijão.

Parâmetros analíticos	Curvas analíticas	
	em solvente	no extrato
Coef. regressão (r)	0,99937	0,99858
Coef. determinação (R <sup>2</sup> )	0,99873	0,99716
Equação da reta	$A = 5,6 + 33673,3 \times C_{TMX}$	$A = -428,7 + 29761,0 \times C_{TMX}$
Faixa de trabalho (mg L <sup>-1</sup> )	0,010 a 1,000	0,010 a 1,000

Através da comparação das inclinações das curvas analíticas, nota-se a ausência de sobreposição das retas, portanto, a presença de um efeito matriz no método. Quantitativamente, a porcentagem do efeito matriz (%EM) do método pode ser calculado a partir da Equação 1, que considera os valores das inclinações (coeficiente angular) das duas curvas. A %EM obtida para o método foi de -11,6 %, confirmando uma pequena influência de componentes da matriz na quantificação do tiametoxam. De acordo com Economou *et al.* (2009), o efeito matriz pode ser considerado negligenciável quando inferior a 20 % (ECONOMOU *et al.*, 2009). O sinal dos efeitos, positivo ou negativo, denota ao aumento ou à diminuição do sinal da espécie de interesse e são causados por interferentes advindos da amostra que perturbam o sinal do analito. Logo, apesar do preparo do extrato em acetato de etila, não se observa a coeluição de substâncias no tempo de retenção do tiametoxam. Por fim, o resultado obtido pode confirmar a seletividade e a eficiência do método, principalmente durante o preparo da amostra, em relação ao isolamento do analito dos interferentes da matriz, mesmo considerando uma matriz complexa como os grãos de feijão e ausência de etapa de limpeza durante o processo de preparação de amostra.

#### 4.2.3 Precisão do método

Na validação intralaboratorial, a precisão de um método pode ser estabelecida em dois níveis distintos: repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial (SANTE, 2022). Nesse trabalho, avaliou-se a precisão do método de determinação do tiametoxam nas amostras de grãos de feijão em seus dois níveis medidos dentro do laboratório.

#### 4.2.3.1 Repetibilidade

A repetibilidade do método desenvolvido e otimizado foi avaliada pela análise da amostra fortificada com os padrões do tiametoxam nas concentrações  $5\times\text{LOQ}$  e  $10\times\text{LOQ}$ , em seis replicatas cada, como recomendado pelo documento SANTE/11312/2021 (SANTE, 2022). Para isso, todas as condições de realização do método foram mantidas constantes e inalteradas e, portanto, com o mesmo analista, dia, local, instrumento nas condições otimizadas da ESL-PBT. Portanto, a repetibilidade do método foi avaliada de acordo com o Documento SANTE/11312/2021, sendo o desvio padrão relativo das medidas realizadas em sextuplicatas apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Resultados da precisão, no nível de repetibilidade, do método ESL-PBT para determinação de resíduos de tiametoxam de amostras de grãos de feijão ( $n = 6$ ).

$C_{\text{Tiametoxam}} \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$	Replicatas	Recuperação (%)	RSD (%)
0,050 ( $5\times\text{LOQ}$ )	1	97,2	1,3
	2	97,0	
	3	99,8	
	4	99,9	
	5	98,6	
	6	99,3	
0,100 ( $10\times\text{LOQ}$ )	1	89,8	1,4
	2	91,5	
	3	90,6	
	4	93,3	
	5	90,5	
	6	90,0	

De acordo com os dados dispostos na Tabela 7, os valores de RSD para as repetições da extração de tiametoxam de grãos de feijão empregando o método ESL-PBT otimizado sob as mesmas condições equivalem a 1,3 e 1,4 % para os níveis  $5\times\text{LOQ}$  e  $10\times\text{LOQ}$ , respectivamente. Portanto, o método em questão apresenta boa repetibilidade, uma vez que o RSD é menor que 20 %, conforme os critérios de aceitação preconizados pelo documento SANTE/11312/2021 (SANTE, 2022).

#### 4.2.3.2 Reprodutibilidade intralaboratorial

A reprodutibilidade intralaboratorial do método para determinação de tiametoxam em grãos de feijão foi avaliada de acordo com o documento SANTE/11312/2021. As amostras dos grãos de feijão foram fortificadas em dois níveis de concentração do agrotóxico, 5×LOQ e 10×LOQ, em sextuplicata cada, com as extrações realizadas de forma idêntica, porém, realizadas em dois dias diferentes e executadas por dois analistas distintos, totalizando-se 12 repetições para cada nível de concentração do tiametoxam. A reprodutibilidade intralaboratorial foi expressa pelo desvio padrão relativo destas 12 medidas e os resultados são expostos na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados da precisão, no nível de reprodutibilidade intralaboratorial, do método ESL-PBT para determinação de resíduos de tiametoxam de amostras de grãos de feijão ( $n = 12$ ).

C <sub>Tiametoxam</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Réplicas	Recuperação (%)		RSD (%)
		1º dia Analista A	2º dia Analista B	
0,050 (5×LOQ)	1	97,2	96,2	2,6
	2	97,0	100,1	
	3	99,8	101,9	
	4	99,9	96,1	
	5	98,6	99,3	
	6	99,3	105,4	
0,100 (10×LOQ)	1	89,8	76,8	7,4
	2	91,5	78,8	
	3	90,6	81,5	
	4	93,3	75,4	
	5	90,5	75,3	
	6	90,0	76,1	

De acordo com os resultados da Tabela 8, a precisão intermediária do método de determinação de tiametoxam em grãos de feijão pode ser considerada adequada, visto que os valores de RSD para as duas concentrações avaliadas foram de 2,6 e 7,4 %, respectivamente e, assim, abaixo dos 20 %, de acordo com o documento SANTE/11312/2021. Logo, mesmo variando os dias e os analistas, o método de determinação de tiametoxam dos grãos de feijão se apresentou preciso. Apesar da complexidade da matriz e da inexistência de um método oficial para a comparação, o método ESL-PBT pode ser considerado de boa precisão.

#### 4.2.4 Exatidão do método

A exatidão do método para determinação de tiametoxam em grãos de feijão foi estabelecida após a extração em seis replicatas do tiametoxam das amostras fortificadas em dois níveis distintos,  $5\times\text{LOQ}$  e  $10\times\text{LOQ}$ . Além disso, as análises foram realizadas em dois dias distintos e por dois analistas diferentes. As taxas de recuperação obtidas para o agrotóxico na matriz foram calculadas a partir da Equação 4 e, desse modo, a exatidão do método foi expressa em valores percentuais de recuperação do tiametoxam. Os ensaios de adição e recuperação empregados para a avaliação da exatidão do método é o mais empregado para a validação de metodologias analíticas de determinação de multirresíduos de agrotóxicos, principalmente pela inexistência ou alto custo de materiais de referência certificados (MRC) das amostras ou de métodos analíticas oficiais padrão. As taxas de recuperação obtidas para o tiametoxam das amostras de grãos de feijão são apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9. Taxas de recuperação do tiametoxam nas amostras de grãos de feijão pelo método ESL-PBT.

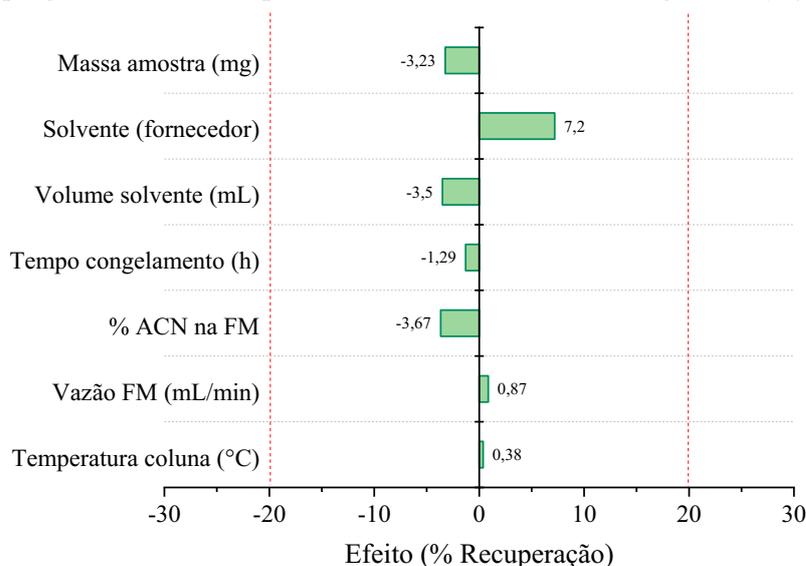
$C_{\text{Tiametoxam}}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Analista A – dia 1		Analista B – dia 2	
	$C_{\text{TMX}}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ ) recuperada	% Recuperação	$C_{\text{TMX}}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ ) recuperada	% Recuperação
0,050 ( $5\times\text{LOQ}$ )	0,049	97,2	0,048	96,2
	0,049	97,0	0,050	100,1
	0,050	99,8	0,051	101,9
	0,050	99,9	0,048	96,1
	0,049	98,6	0,050	99,3
	0,050	99,3	0,053	105,4
0,100 ( $10\times\text{LOQ}$ )	0,090	89,8	0,077	76,8
	0,092	91,5	0,079	78,8
	0,091	90,6	0,082	81,5
	0,093	93,3	0,075	75,4
	0,091	90,5	0,075	75,3
	0,090	90,0	0,076	76,1

Através dos dados apresentados na Tabela 9, pode ser observado que as porcentagens de recuperação do tiametoxam em grãos de feijão, utilizando-se o método ESL-PBT otimizado, ficaram na faixa de 75,3 a 105,4 %. Portanto, os valores situam-se dentro dos critérios de aceitação do documento SANTE/11312/2021, que estabelece uma faixa de 70 a 120 % como aceitável para as taxas de recuperação de resíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos e rações. Assim, o método proposto pode ser considerado de boa exatidão.

#### 4.2.5 Estudo da robustez via teste de Youden

Nesse trabalho, para se avaliar a robustez do método desenvolvido, foi aplicado o teste de Youden (YOU DEN; STEINER, 1975). Logo, foram estudados sete fatores em dois níveis cada: massa de amostra, solvente (fornecedor), volume de solvente, tempo de congelamento, porcentagem de acetonitrila na fase móvel, vazão da fase móvel e temperatura da coluna. Tais fatores estão suscetíveis a variações durante análises de rotina envolvendo o método proposto. Os dois níveis de variação testados foram a condição original otimizada para cada fator e uma pequena alteração desse valor de forma deliberada. Logo, avalia-se a robustez do método analítico em questão, a partir dos efeitos da variação sobre a porcentagem de recuperação do tiametoxam. Os resultados obtidos, referentes aos efeitos para cada um dos sete fatores avaliados, estão apresentados na Figura 14.

Figura 14. Efeito dos sete fatores avaliados, em dois níveis distintos, no estudo de robustez do método, empregando a ESL-PBT para extração de tiametoxam em grãos de feijão.



A partir do gráfico da Figura 14, nota-se que, para cada fator analisado, as variações provocadas no método de forma deliberada não apresentaram efeitos tão significativos, capazes de afetar a resposta analítica. Para que o método seja considerado robusto, o mesmo deve apresentar uma variação da taxa de recuperação inferior a 20 % (SANTE, 2022). Todos os fatores avaliados apresentaram uma porcentagem de efeito na resposta inferior a 7,2 %, indicando que o método desenvolvido pode ser considerado robusto e, dessa forma, a resposta do analito resiste às mudanças nestes fatores. O fator que causou maiores efeitos na taxa de recuperação foi a troca da marca da acetonitrila na fase móvel. Para esse fator, o efeito foi de

um aumento de 7,2 % na taxa de recuperação do tiametoxam das amostras de grãos de feijão. O fator de menor efeito no método, dentre aqueles que tiveram pequenas mudanças da condição otimizada, foi a temperatura da coluna que resultou em um aumento de +0,38 % na taxa de recuperação.

## 5 CONCLUSÕES

Em vista dos resultados obtidos e apresentados neste trabalho, pode-se concluir que a extração do tiametoxam de grãos de feijão, empregando-se o método ESL-PBT, foi alcançada com considerável eficiência na recuperação, de forma rápida e com detectabilidade adequada. A otimização do método compreendeu os estudos da massa de amostra, solvente extrator e volume empregado, sal de partição e tempo de congelamento. Estes fatores foram reduzidos para se ajustarem às características da extração sólido-líquido com partição à baixa temperatura e a disponibilidade da amostra. Nesse sentido, o solvente extrator empregado apresentou miscibilidade à água, o que não se observa com aqueles empregados na extração sólido-líquido tradicional, além de se manter em fase líquida durante o congelamento.

Durante a validação, foi evidenciada a boa precisão do método, a partir dos estudos da repetibilidade e da reprodutibilidade intralaboratorial nos dois níveis de concentração avaliados próximos do limite de quantificação do método. Ademais, o método mostrou-se robusto, frente às pequenas variações deliberadas que são sujeitas a ocorrerem na rotina do laboratório, como também se apresentou seletivo ao sinal do analito e sensível à diferentes concentrações da espécie de interesse. O limite de quantificação foi de  $0,08 \text{ mg kg}^{-1}$  de tiametoxam em grãos de feijão, que é inferior ao limite máximo de resíduos para este inseticida na leguminosa,  $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ , o que propiciará a aplicação do método na determinação de tiametoxam em amostras de grãos de feijão. A partir do desenvolvimento e validação do método pretende-se aplicá-lo em trabalhos futuros para monitorar os resíduos de tiametoxam em grãos de feijão coletados de plantas do feijoeiro que estão sendo submetidas a diferentes tratamentos com o inseticida em experimento realizado na Casa de Vegetação instalada na Universidade Federal de Uberlândia, *campus Pontal*.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR JÚNIOR, C.A.S.; SILVA, N.M.T.; SOARES, D.F.; FARIA, A.M. Extração em fase sólida de resíduos de agrotóxicos de água superficial, empregando um sorvente de menor retenção. *Química Nova*, v. 41, p. 641-647, 2018. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170223>
- AMBROSIO, I.S.; OTAVIANO, C.M.; CASTILHO, L.M.B.; SANTOS, A.L.R.; MENDONÇA, J.S.; FARIA, A.M. Development and validation of a solid-liquid extraction with low-temperature partitioning method for the determination of fipronil in turtle eggshell. *Microchemical Journal*, v. 178, 107393, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107393>
- ARAGÃO, N.M.D.; VELOSO, M.C.D.C.; ANDRADE, J.B.D. Validação de métodos cromatográficos de análise: um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “Química Verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. *Química Nova*, v. 32, p. 2476-2481, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000900043>
- ATKINS, P. W. **Físico-Química - Fundamentos**, 5ª ed. São Paulo: LTC Editora, 2011.
- ATKINS, P.; JONES, L.; LAVERMAN, L. **Princípios de Química: Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente**. Rio de Janeiro: Bookman Editora, 2018.
- BARROS, A.L.C. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura para a análise de agrotóxicos via UHPLC-ESI-MS/MS em águas superficiais em Ouro Branco/MG. 2014. 133f. Mestrado (Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014. <http://www.repositorio.ufop.br/jspui/handle/123456789/4232>
- BARROS NETO; B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, E. R. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Bookman, 2010.
- BATISTA, V.S. Estudos de modelagem molecular de compostos bioativos frente ao receptor nicotínico de acetilcolina do subtipo alfa4beta2. 2016. 124f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Química) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2016. <http://hdl.handle.net/11449/155534>
- BRIGIDE, P. Disponibilidade de ferro em grãos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) irradiados. 2002. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002. <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-13082002-140756/pt-br.php>
- BUENO, M. **Deriva e análise de risco das aplicações de fungicidas, herbicidas e inseticidas nas culturas do feijão e da soja**. 2015. Universidade Federal de Uberlândia, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/12088>
- CAMPOS, K.R.R.D. Emprego da extração sólido-líquido por partição à baixa temperatura para extração de propoxur de amostras de carne bovina. 2021. 53f. Mestrado (Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021. <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-05082021-161735>
- CARBONELL, S.A.M.; CHIORATO, A.F.; BEZERRA, L.M.C. A planta e o grão de feijão e as formas de apresentação aos consumidores, vol. 6, p. 101-116. *IN: FERREIRA, C.M.; BARRIGOSI, J.A.F. Arroz e feijão: tradição e segurança alimentar* (ed.). Brasília: Embrapa, 2021.
- CARVALHO, M.M.X.; NODARI, E.S.; NODARI, R.O. “Defensivos” ou “agrotóxicos”? História do uso e da percepção dos agrotóxicos no estado de Santa Catarina, Brasil, 1950-2002. *História, Ciências e Saúde – Manguinhos*, v. 24, p. 75-91, 2017. <https://doi.org/10.1590/S0104-59702017000100002>

CASTANHO, R.B.; SOUTO, T. Produção de cana-de-açúcar na Mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil. *Brazilian Geographical Journal*, v. 4, p. 27-54, **2013**.

CASTELLANOS, C.I.S.; ALMEIDA, A.S.; BORGES, C.T.; DEUNER, C.; MENEGHELLO, G.E. Thiamethoxam treated bean seeds performance during storage. *Agrária*, v. 12, p. 1-5, **2017**. <https://doi.org/10.5039/agraria.v12i1a5408>

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

COSTA, C.L.; NAGAI, H.; COSTA, A.S. Controle da cigarrinha verde em feijão. *Bragantia*, v. 21, p. LXVII-LXXI, **2010**. <https://doi.org/10.1590/S0006-87051962000100066>

DELLAMATRICE, P.M.; MONTEIRO, R.T.R. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental*, v. 18, p. 1296-1301, **2014**. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v18n12p1296-1301>

DUFOUR, V.; WIEST, L.; SLABY, S.; LE COR, F.; AUGER, L.; CARDOSO, O.; CURTET, L.; PASQUINI, L.; DAUCHY, X.; VULLIET, E.; BANAS, D. Development of a simple multiresidue extraction method for the quantification of a wide polarity range list of pesticides and transformation products in eggs by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, v. 1628, 461447, **2020**. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461447>

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. *J. Chromatogr. A*, v. 1216, p. 5856-5867, **2009**. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.031>

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. Espaço temático: Plantas daninhas. **2023**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/tema-plantas-daninhas>, acesso em 17 abr. 2023.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. Grãos. **2021**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/feijao/pos-producao/graos>, acesso em 12 abr. 2023.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Codex pesticide residues in food online database. **2019**. Disponível em: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codextexts/dbs/pestres/en>, acesso em: 12 abr. 2023.

FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12, p. 175-204, **2000**. <https://www.uv.mx/personal/tcarmona/files/2010/08/Gui-y-Alvez-19991.pdf>

FERREIRA, P.G.; HÜTHER, C.M.; CARVALHO, A.S.; FOREZI, L.S.M.; SILVA, F.C.; FERREIRA, V.F. Nicotina e a Origem dos Neonicotinoides: Problemas ou Soluções? *Revista Virtual de Química*, v. 14, **2022**. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20220079>

FRIEDRICH, K.; SILVEIRA, G.R.; AMAZONAS, J.C.; GURGEL, A.M.; ALMEIDA, V.E.S.; SARPA, M. Situação regulatória internacional de agrotóxicos com uso autorizado no Brasil: potencial de danos sobre a saúde e impactos ambientais. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 37, e00061820, **2021**. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00061820>

GARCIA, E.G.; BUSSACOS, M.A.; FISCHER, F.M. Impacto da legislação no registro de agrotóxicos de maior toxicidade no Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 39, p. 832-839, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102005000500020>

GEBLER, L.; SPADOTTO, C.A. Comportamento ambiental dos herbicidas. In: VARGAS, L.; ROMAN, E.S. Manual de manejo e controle de plantas daninhas. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. p. 59. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/543494>

GOULART, A.C.; FARIA, A.M.; GOULART, S.M. Agrotóxicos: Uma revisão sobre suas propriedades físico-químicas de interesse ambiental. **Ciências Agrárias Multidisciplinares: Avanços e Aplicações Múltiplas**. Rio de Janeiro: Editora e-Publicar, 2022. <https://doi.org/10.47402/ed.ep.c20222318150>

HANSON, B.; BOND, C.; BUHL, K. Pesticide vapor pressure fact sheet; national pesticide information center, Oregon State University. 2016. Disponível em: <http://npic.orst.edu/factsheets/vaporpressure.html>, acesso em 12 abr. 2023.

HILTON, M.J.; JARVIS, T.D.; RICKETTS, D.C. The degradation rate of thiamethoxam in European field studies. *Pest Management Science*, v. 72, p. 388-397, 2016. <https://doi.org/10.1002/ps.4024>

HYDE, A.M.; ZULTANSKI, S.L.; WALDMAN, J.H.; ZHONG, Y.; SHEVLIN, M.; PENG, F. General principles and strategies for salting-out informed by the Hofmeister series. *Organic Process Research & Development*, v. 21, np. 1355-1370, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.7b00197>

KIM, L.; LEE, D.; CHO, H.; CHOI, S. Review of the QuEChERS method for the analysis of organic pollutants: Persistent organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pharmaceuticals. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, v. 22, e00063, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2019.e00063>

LIMA, R.S.; FERREIRA NETO, J.A.; FARIAS, R.D.C.P. Alimentação, comida e cultura: O exercício da comensalidade. *Demetra: Alimentação, Nutrição & Saúde*, v. 10, p. 507-522, 2015. <https://doi.org/10.12957/demetra.2015.16072>

LÓPEZ-RUIZ, R.; MARÍN-SÁEZ, J.; PRESTES, O.D.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A.G. Critical evaluation of analytical methods for the determination of anthropogenic organic contaminants in edible oils: An overview of the last five years. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2022, in press. <https://doi.org/10.1080/10408347.2022.2040352>

MAPA – Ministério da Agricultura e Pecuária. Tratamento fitossanitário e quarentenário, publicado em 02 de dezembro de 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/guia-de-servicos/tratamento-fitossanitario-e-quarentenario>, acesso em 17 abr. 2023.

NASIRI, M.; AHMADZADEH, H.; AMIRI, A. Sample preparation and extraction methods for pesticides in aquatic environments: A review. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, v. 123, 115772, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115772>

NOCELLI, R.C.F.; ROAT, T.C.; ZACARIN, E.C.M.S.; MALASPINA, O. Riscos de Pesticidas sobre as Abelhas. Embrapa, 2010. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/69299/1/Roberta.pdf>, acesso em 17 abr. 2023.

OLIVEIRA, M. F.; BRIGHENTI, A. M. Comportamento dos herbicidas no ambiente, p. 263-304. In: OLIVEIRA J. R.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. (Ed.). **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. Curitiba: Ompipax, 2011. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/904895>

PAVANI, N.D. Pesticidas: Uma revisão dos aspectos que envolvem esses compostos. 2016. 64f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) – Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2016. <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/136596/000860464.pdf>

PRESTES, O.D.; FRIGGI, C.A.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Química Nova*, v. 32, p. 1620-1634, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000600046>

RIZZARDI, M.A.; FLECK, N.G.; VIDAL, R.A.; MEROTTO JR., A.; AGOSTINETTO, D. Competição por recursos do solo entre ervas daninhas e culturas. *Ciência Rural*, v. 31, p. 707-714, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782001000400026>

RODRIGUES, A.A.Z.; QUEIROZ, M.E.L.R.; FARONI, L.R.D.; PRATES, L.H.F.; NEVES, A.A.; OLIVEIRA, A.F.; FREITAS, J.F.; HELENO, F.F.; ZAMBOLIM, L. The efficacy of washing strategies in the elimination of fungicide residues and the alterations on the quality of bell peppers. *Food Research International*, v. 147, 110579, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110579>

SANTOS, S.S.V.D. Análise do risco de contaminação do solo por carbofurano no cultivo de pupunha no alto curso do vale do rio Ribeira de Iguape (SP). 2018. 110f. Mestrado (Geografia Física) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/8/8135/tde-02052018-161259>

SILVA, J.A.B.; FONTANA, R.L.M.; COSTA, S.S.; RODRIGUES, A.J. Teorias demográficas e o crescimento populacional no mundo. *Caderno de Graduação - Ciências Humanas e Sociais - UNIT - SERGIPE*, v. 2, p. 113-124, 2015. <https://periodicos.set.edu.br/cadernohumanas/article/view/1951/1209>

SILVA, J.B.C.; GIORDANO, L.B.; FURUMOTO, O.; BOITEUX, L.S.; FRANÇA, F.H.; VILLAS BÔAS, G.L.; BRANCO, M.C.; MEDEIROS, M.A.; MAROUELLI, W.; SILVA, W.L.C.; LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C.; NASCIMENTO, W.M.; PEREIRA, W. Cultivo de tomate para industrialização - Pragas - Mosca branca (*Bemisia argentifolii*). Embrapa Hortaliças, Sistemas de Produção, 1-2ª Ed., 2006.

SILVA, K.C.C. Caracterização da Acetilcolinesterase cerebral de tucunaré, *Cichla ocellaris* (BLOCH & SCHNEIDER, 1801): efeito de íons e pesticidas organofosforados e carbamatos sobre sua atividade. Recife, 2012. 78f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012. <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/12713>

SILVA, R.A.G.; FARIA, A.M. Determinação de multirresíduos de agrotóxicos em méis produzidos na região do triângulo mineiro por UHPLC-MS/MS. *Química Nova*, v. 43, p. 307-313, 2020. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170492>

SILVEIRA, H. Qualidade física e fisiológica de sementes de feijão carioca comercializadas na cidade de Pato Branco - Paraná. 2022. 33f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2022. <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/29052>

SILVEIRA, M.A. Percepção da competitividade da produção e comercialização de feijão pela agricultura familiar no estado de Goiás. 2015. 183f. Dissertação (Mestrado em Agronegócio) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015. <http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/5172>

SOUSA, J.D.S.; SANTOS, M.M.; SANTOS, B.N.; SANTOS, N.M.M.; PINTO, L.C. Agricultura em Áreas Industriais e Contaminação por Metais Pesados: Estratégias para redução deste Impacto Ambiental. *Revista Brasileira de Geografia Física*, v. 14, p. 322-331, 2021. <https://doi.org/10.26848/rbgf.v14.1.p322-331>

SANTE, European Commission. 2022. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, SANTE/11312/2021. Disponível em: [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides\\_mrl\\_guidelines\\_wrkdoc\\_2019-12682.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2019-12682.pdf)

SUEKANE, R.; DEGRANDE, P.E.; LIMA JÚNIOR, I.S.; QUEIROZ, M.V.B.M.; RIGONI, E.R. Danos da Mosca-Branca Bemisia Tabaci (Genn.) e distribuição vertical das ninfas em cultivares de soja em casa de vegetação. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 80, p. 151-158, 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/6tLzjL6L58DpztMgP5R6Gyf/>

WHO, World Health Organization – Codex Alimentarius International Food Standards. 2017. Guidelines on performance criteria for methods of analysis for the determination of pesticide residues in food and feed (CXG 90-2017). Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/en/>

YOU DEN, W.J.; STEINER, E.H. **Statistical manual of the AOAC** – Association of Official Analytical Chemists. Washington DC: AOAC-1, 1975.

ZHANG, L.; LIU, S.; CUI, X.; PAN, C.; ZHANG, A.; CHEN, F. A review of sample preparation methods for the pesticide residue analysis in foods. *Open Chemistry*, v. 10, p. 900-925, 2012. <https://doi.org/10.2478/s11532-012-0034-1>