



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



AMANDA HELENA PIRONI ZANZARINI

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE
METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE TIAMETOXAM EM
FOLHAS DE FEIJOEIRO**

Ituiutaba/MG

2023

AMANDA HELENA PIRONI ZANZARINI

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA
DETERMINAÇÃO DE TIAMETOXAM EM FOLHAS DE FEIJOEIRO**

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

Orientador: Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria

Ituiutaba/MG

2023

AMANDA HELENA PIRONI ZANZARINI

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA
DETERMINAÇÃO DE TIAMETOXAM EM FOLHAS DE FEIJOEIRO**

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

Ituiutaba, 28 de junho de 2023

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Renata Galvão de Lima (ICENP/UFU)

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

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao nosso Deus e Nossa Senhora Aparecida que nunca me desampararam e me deixaram desistir. Dedico todo meu esforço a minha mãe que não me deixou só nessa caminhada e permitiu que tudo fosse possível. Ao meu pai que mesmo ausente, mandou-me forças para persistir. Faço jus aos meus irmãos, avós e amigos que sempre acreditaram em mim.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus e Nossa Senhora Aparecida por todas as bênçãos cedidas e orações atendidas.

Aos meus pais que batalharam para me educar e proporcionar todas as ferramentas necessárias para que eu fosse quem sou hoje.

À minha mãe querida, que não mediu esforços para que pudesse realizar esse sonho e, mesmo que distante, sempre se manteve presente. Agradeço pelas vezes em que segurou minha mão para que não caísse e caso não pudesse impedir, por aquelas em que me ensinou a levantar e seguir. Por ser fortaleza e ponto de paz.

Ao meu pai que embora não tenha presenciado nenhuma etapa desse ciclo, sei que sempre esteve aqui me fortalecendo.

Aos meus irmãos, Nathiely e Guilherme, que foram importantes alicerces para minha família enquanto estive ausente e por me apoiarem em minhas decisões.

Aos meus avós que me deram forças nos longos finais de semanas distante de casa e que sempre torceram pela minha felicidade e vitória. São minhas grandes inspirações!

Ao meu professor e orientador, Dr. Anizio Marcio de Faria, pela grandiosa oportunidade de vivenciar a pesquisa científica e conhecer o universo lindo da química analítica. Agradeço a imensa paciência, por toda ajuda e também por todo o conhecimento repassado a nós alunos, com grande dedicação e amor.

Agradeço aos meus queridos professores do curso de Química - ICENP/UFU pelo enorme privilégio em compartilhar vivências, experiências e aprendizados com cada um. Gratidão por integralizarem a química de forma harmônica e apaixonante e, por contribuírem com minha formação.

Aos meus amigos e colegas que fizeram essa experiência mais leve, apesar de tudo o que a vida nos submete. Agradeço cada risada, companheirismo, lágrimas e comemorações que me fizeram mais segura para prosseguir até o fim.

Agradeço ao grupo de pesquisa CroMat, em especial ao Allyson e à Laís, pelo apoio e aprendizado ao longo desse processo e por não nos deixarem desanimar.

Agradeço às agências de fomento que viabilizaram a realização desta pesquisa: ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de iniciação científica concedidas 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).

Enfim, sou imensamente grata por todos que fizeram parte dessa minha trajetória e por contribuírem, mesmo que pouco, para me tornar uma pessoa melhor.

EPÍGRAFE

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação.”
(Simone de Beauvoir)

RESUMO

Os inseticidas desempenham um papel importante no combate a insetos na agricultura e por isso, têm sido a solução mais rápida e eficiente para evitar a perda de produtividade e prejuízos econômicos. O tiametoxam, inseticida da classe dos neonicotinoides, mostrou-se eficiente no combate aos insetos que incidem no feijoeiro. No entanto, as formas de aplicação do agrotóxico contaminam os solos e/ou os grãos de feijão, acometendo o meio ambiente e a saúde humana. Desse modo, o presente estudo possui a finalidade de desenvolver uma metodologia para a quantificação do tiametoxam, de forma a controlar e monitorar as concentrações do inseticida nas folhas de feijão. O método de preparação da amostra foi baseado na extração sólido-líquido com partição à baixa temperatura (ESL-PBT), cuja partição do analito ocorreu das folhas de feijão em solução aquosa para uma solução orgânica coletada para análise. Os extratos foram analisados pela técnica da cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD), a qual atua na separação dos compostos da amostra, garantindo seletividade para o analito. Essa metodologia foi selecionada por se tratar de um processo de fácil automação, simples, com curto tempo de execução, pouca intervenção do analista e menor geração de resíduos orgânicos em comparação àqueles presentes na literatura. Nesse ínterim, o método otimizado apresentou ótimas recuperações do analito, próximas à 100 %, utilizando 100 mg de amostra de folhas, uma proporção de volumes de água:acetonitrila de 2,0:4,0 mL e 2 horas de congelamento. As figuras de mérito do método o validaram como linear no intervalo de concentrações de 0,005 a 0,5 mg L⁻¹, sendo o primeiro ponto o limite de quantificação, que se encontra abaixo do limite máximo de resíduos para o tiametoxam em grãos de feijão. Além disso, demais parâmetros como boa seletividade, sensibilidade, precisão, exatidão e robustez sugerem confiabilidade ao método. Portanto, já que as figuras de mérito atenderam às especificações do guia de validação de métodos, documento SANTE/11312/2021, a metodologia apresentada neste trabalho é adequada e eficiente para ser empregada na determinação de tiametoxam em folhas de feijoeiro.

Palavras-chave: Extração sólido- líquido com partição à baixa temperatura, cromatografia líquida de alta eficiência, folhas de feijoeiro, tiametoxam.

ABSTRACT

Insecticides play an essential role in combating insects in agriculture and, therefore, have been the fastest and most efficient solution to avoid loss of productivity and economic losses. Thiamethoxam, an insecticide of the neonicotinoid class, proved to be efficient in combating insects that affect common bean plants. However, the forms of pesticide application contaminate the soil and bean grains, affecting the environment and human health. Thus, the present study aimed the development a methodology for the thiamethoxam quantification in bean leaves. The sample preparation method was based on solid-liquid extraction with a low-temperature partition (SLE-LTP), in which the analyte partition occurred from bean leaves in an aqueous solution to an organic solution collected for analysis. The extracts were analyzed using high-performance liquid chromatography with detection by diode array (HPLC-DAD). The SLE-LTP was selected because it is easy to automate, simple, with a short execution time, little intervention by the analyst, and less generation of organic waste compared to the literature. The optimized method showed excellent analyte recoveries, close to 100%, using 100 mg of leaf sample, water:acetonitrile ratio of 2.0:4.0 mL, and 2 hours of freezing. The merit figures of the method validated it as linear in the range of concentrations from 0.005 to 0.5 mg L⁻¹, the first point being the quantification limit, which is below the maximum residue limit for thiamethoxam in bean grains. In addition, other parameters such as good selectivity, sensitivity, good precision and accuracy, and robustness suggest a reliable method for thiamethoxam extraction. Therefore, since the figures of merit met the specifications of the method validation guide, document SANTE/11312/2021, the proposed methodology is adequate and efficient for the thiamethoxam determination in bean leaves.

Keywords: Solid-liquid extraction with a low-temperature partitioning, high-performance liquid chromatography, bean leaves, thiamethoxam.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
ACN	Acetonitrila
BRS	Brasil Sementes
CG	Cromatografia gasosa
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
%EM	Porcentagem de efeito matriz
ESL-PBT	Extração sólido-líquido com partição à baixa temperatura
FA	Fase aquosa
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
FO	Fase orgânica
K_{ow}	Constante de partição octanol: água
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
LMR	Limite máximo de resíduos
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe</i> (Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro)
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i> (Desvio padrão relativo)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Matriz do planejamento de experimentos para a avaliação da robustez da ESL-PBT de tiametoxam de amostras de folhas de feijão, empregando o teste de Youden. _____	33
Tabela 2- Parâmetros analíticos da relação entre a concentração do tiametoxam e a resposta analítica do método cromatográfico. _____	46
Tabela 3- Parâmetros relacionados às curvas analíticas para o tiametoxam obtidas pelo método do padrão externo e da calibração no extrato. _____	48
Tabela 4- Porcentagens de recuperação e desvios padrão relativos para o tiametoxam extraído pelo método de ESL-PBT de folhas de feijoeiro em dois níveis de fortificações. _____	50
Tabela 5- Porcentagens de recuperação e desvios padrão relativos para o tiametoxam extraído pelo método de ESL-PBT de folhas de feijoeiro em dois níveis de fortificações em diferentes dias por analistas distintos. _____	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química da nicotina protonada em pH fisiológico (7,40). _____	18
Figura 2- Estrutura química do tiametoxam. _____	19
Figura 3- Cromatogramas dos extratos obtidos da ESL-PBT de tiametoxam de uma amostra fortificada e do branco. Condições de análise: FM metanol:água (30:70, v/v), vazão de 1,0 mL min ⁻¹ , detecção DAD a 254 nm, temperatura de 35 °C. _____	35
Figura 4- Imagem da separação das fases aquosa e orgânica na ESL-PBT de tiametoxam de folhas de feijoeiro. _____	36
Figura 5- Imagem dos extratos da ESL-PBT de tiametoxam de folhas de feijão. _____	37
Figura 6- Porcentagens de recuperação do tiametoxam das folhas de feijoeiro pela ESL-PBT, empregando os solventes acetonitrila e acetato de etila. _____	38
Figura 7- Porcentagens de recuperação do tiametoxam das folhas de feijoeiro pela ESL-PBT em função da massa das amostras de 50, 100 e 250 mg. _____	39
Figura 8- Porcentagens de recuperação de tiametoxam das folhas de feijoeiro pela ESL-PBT empregando diferentes combinações de volumes de água e solvente extrator. _____	41
Figura 9- Porcentagens de recuperação de tiametoxam das folhas de feijoeiro pela ESL-PBT em função de diferentes tempos de congelamento. _____	42
Figura 10- Relação entre as concentrações de soluções padrão de tiametoxam em acetonitrila e a área do pico do inseticida nos cromatogramas. _____	46
Figura 11- Curvas analíticas obtidas na faixa de trabalho do método a partir de soluções padrão de tiametoxam preparadas em acetonitrila e no extrato da matriz. _____	47
Figura 12- Efeitos da modificação de algumas variáveis na metodologia de determinação de tiametoxam em folhas de feijoeiro, conforme teste de Youden (1975). _____	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 O contexto do feijão no Brasil	15
1.1.1 O BRS Radiante (Rajado)	16
1.2 Inseticidas no controle das pragas do feijoeiro	16
1.2.1 Inseticidas neonicotinoides	17
1.3 Métodos de preparação de amostra	20
1.3.1 Extração sólido-líquido com partição à baixa temperatura	21
1.4 Técnicas analíticas	22
1.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos	23
2 OBJETIVOS	25
3 METODOLOGIA	26
3.1 Materiais, solventes e reagentes	26
3.2 Análises cromatográficas	26
3.3 Obtenção das amostras de folhas do feijoeiro	27
3.3.1 Processamento das amostras	27
3.4 Preparação das soluções padrão de tiametoxam	27
3.5 Preparação da curva analítica	27
3.6 Otimização da ESL-PBT de tiametoxam de amostras de folhas de feijoeiro	28
3.6.1 Avaliação do solvente extrator	28
3.6.2 Massa da amostra	28
3.6.3 Proporção dos volumes de água e de solvente extrator	29
3.6.4 Tempo de congelamento	29
3.7 Validação da metodologia de determinação do tiametoxam das folhas de feijoeiro	29
3.7.1 Seletividade	30
3.7.2 Linearidade	30
3.7.3 Limite de quantificação (LOQ)	30
3.7.4 Faixa dinâmica linear	31
3.7.5 Sensibilidade	31
3.7.6 Efeito matriz	31
3.7.7 Precisão e exatidão	32
3.7.8 Robustez	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34

4.1 Desenvolvimento do método de quantificação de tiametoxam _____	34
4.2 Otimização da ESL-PBT de tiametoxam de folhas de feijoeiro _____	35
4.2.1 Avaliação do solvente extrator _____	37
4.2.2 Massa da amostra _____	38
4.2.3 Volumes de água e solvente extrator _____	40
4.2.4 Tempo de congelamento _____	42
4.3 Validação do método de determinação de tiametoxam em folhas de feijoeiro _____	43
4.3.1 Seletividade _____	43
4.3.2 Limite de quantificação _____	44
4.3.3 Linearidade _____	45
4.3.4 Faixa dinâmica linear e sensibilidade _____	47
4.3.5 Efeito matriz _____	48
4.3.6 Ensaios para avaliação da exatidão e precisão do método _____	49
4.3.7 Robustez _____	51
5 CONCLUSÕES _____	54
REFERÊNCIAS _____	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 O contexto do feijão no Brasil

O feijão, conhecido cientificamente como *Phaseolus vulgaris* L, possui origem nas Américas e é caracterizado pelas suas diversas variedades, sendo que o gênero *Phaseolus* constitui 80 % do total de espécies consumidas (BRASIL, 2021).

Durante a colonização, o feijão já era mencionado como componente alimentar dos indígenas e escravos, bem como ocupava espaço nas escritas de viajantes no início do século XIX, os quais o retratava como um importante alimento nacional. No entanto, a palavra feijão teria sido descrita, inicialmente, no século XIII em Portugal (ELIAS, 2004). Somente em meados do século XVI, surgiram novas espécies deste grão na colônia, além do feijão-preto havia a chegada de algumas variedades africanas e o feijão-fradinho, que era muito consumido em Portugal (ELIAS, 2004). Devido as qualidades desta leguminosa, é inquestionável que se tornou, ao longo dos anos, um relevante ingrediente para a culinária brasileira.

Pertencente à classe Dicotyledoneae, família Leguminosae, subfamília Papilionoidae, gênero *Phaseolus* e espécie *Phaseolus vulgaris* L. (BONETT *et al.*, 2007), o feijão representa um dos principais alimentos que constituem a dieta humana. O consumo anual per capita estimado no Brasil é de 14,3 kg de feijão (COGO, 2020), destacando-se como o terceiro maior consumidor e terceiro maior produtor dessa leguminosa no mundo, atrás apenas de Myanmar e Índia (FERREIRA; BARRIGOSI, 2021). As maiores produções de feijoeiros se concentram nos estados de Paraná, Minas Gerais, Goiás, São Paulo e Bahia (SILVA; WANDER, 2013). O rico valor nutricional agregado a este alimento se baseia no fato de que é uma boa fonte de proteínas, minerais, vitaminas e fibras (DEL PINO; LAJOLO, 2003), sendo utilizado nos grandiosos referenciais de pratos brasileiros, a exemplo, a feijoada e o acarajé. Isso se deve ao fato de que as fibras alimentares, solúveis e insolúveis, são de extrema relevância pois, devido às suas propriedades físico-químicas, podem produzir diversos efeitos fisiológicos no organismo humano, tornando-se responsáveis pela redução do colesterol plasmático (MATTOS; MARTINS, 2000; BONETT *et al.*, 2007).

Além da importância nutricional do feijão, destaca-se o papel socioeconômico fornecido pela cultura do feijoeiro. A vasta região agrícola e a diversificação climática brasileira representam vantagens para o cultivo do feijão no país, já que a leguminosa dispõe de diversos genótipos com adaptação versátil em relação às condições edafoclimáticas (DEMARI *et al.*, 2015). Essa cultura atípica pode ser cultivada em três safras anuais, sendo o plantio da 1ª safra

ou “safra das águas” entre os meses de agosto a novembro e a colheita entre novembro a abril; o plantio da 2ª safra ou “safra das secas” entre os meses de dezembro a abril e a colheita entre abril a julho e o plantio da 3ª safra ou “safra de inverno” entre os meses de abril a julho e a colheita entre agosto a outubro (FUSCALDI; PRADO, 2005; LABINAS, 2002; SILVA; WANDER, 2013). Dessa maneira, o ciclo curto, as épocas de semeadura (preferenciais e não-preferenciais) e o baixo valor agregado à produção são características que possibilitam uma alternativa viável para pequenos agricultores (DEMARI *et al.*, 2015), bem como, implica em reduzidos custos no mercado para consumidores de baixa renda.

1.1.1 O BRS Radiante (Rajado)

No Brasil, existe uma enorme diversidade de espécies de feijão proveniente do desenvolvimento das cultivares do grão. O programa de melhoramento genético do feijoeiro comum da Embrapa Arroz e Feijão prioriza o desenvolvimento e a avaliação de novas cultivares do feijoeiro comum, inovando a produção com grãos maiores e coloridos que são normalmente, consumidos e produzidos em menor escala. Com isso, os grãos pequenos produzidos em grande escala predominam no mercado devido aos baixos custos, enquanto a oferta dos tipos variados de grãos fornece variedade aos consumidores, além da possibilidade de exportação com excedentes da produção (FARIA *et al.*, 2002).

A cultivar BRS Radiante (Rajado) surgiu a partir do cruzamento biparental entre Pompadour e Iraí, configurado na Embrapa Arroz e Feijão. Esse tipo de leguminosa apresenta porte ereto, além da conformidade de coloração e do tamanho dos grãos, sendo qualificável para as culinárias, simples e sofisticadas, embora apresente elevado tempo de cocção (38 minutos, aproximadamente). Dentre as suas qualidades, a resistência ao mosaico-comum e à antracnose, doenças altamente incidentes no feijoeiro, elevam o interesse dos produtores em cultivar feijão do tipo rajado (FARIA *et al.*, 2002).

1.2 Inseticidas no controle das pragas do feijoeiro

Embora o cultivo do feijão no Brasil seja facilmente implementado devido à versatilidade do grão, ele requer uma série de processos e cuidados necessários devido aos fatores que acometem a cultura. A qualidade da produção dessa leguminosa depende do manejo agrônomico, da densidade de colheita, de fatores ambientais, de tratamentos das culturas, distribuição de plantas por área, da qualidade e saúde das sementes, entre outros

(CASTELLANOS *et al.*, 2017). No entanto, um dos principais aspectos que limita a produção de feijão no país é o prejuízo provocado pela existência simultânea de insetos-praga no cultivo. Constituindo-se em mais de 15 espécies de insetos-praga, destacam-se como as principais: as vaquinhas, a mosca branca e a cigarrinha-verde, sendo responsáveis pelos problemas fitossanitários causados aos feijoeiros, além dos consequentes danos econômicos. Pertencente à família Aleyrodidae, a mosca branca corresponde à espécie transmissora de doenças viróticas, a citar o famoso vírus do mosaico-dourado que provocou diminuição da produtividade do feijoeiro em torno de 40 % a 100 % nas lavouras brasileiras (LABINAS, 2002). A cigarrinha-verde é caracterizada por ser um inseto sugador que consome a seiva vegetal e deposita uma toxina, deixando as folhas enroladas e amareladas (LABINAS, 2002), além de diminuir o número de vagens e grãos dos feijoeiros (BOIÇA-JUNIOR, 2000). Já as vaquinhas são insetos classificados como polígafos, em que jovens se alimentam de gramíneas e batatinhas e quando adultos, de folhas de culturas relevantes, de modo que provocam a desfolha, diminuindo a área de fotossíntese da planta (ÁVILA; NAKANO, 1999; LABINAS, 2002). Em síntese, esses patógenos atuam na diminuição de peso e potencial germinativo das sementes, na contaminação das plantas por dejetos e, conseqüentemente, gera uma menor quantidade de plantas por área, reduzindo a produção (BORGES *et al.*, 2015; PEREIRA, 2005). Dessa maneira, muitas formas de combate aos inseto-pragas têm sido realizadas para reduzir as perdas da produção do feijoeiro, sendo o uso de inseticidas a mais rápida e eficiente para este processo.

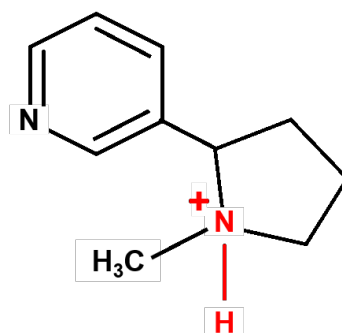
Os inseticidas promovem o controle dos insetos-pragas em diversas culturas. Os inseticidas se tornaram extremamente relevantes para pequenos e grandes agricultores nos últimos anos, haja vista que operam no aumento da cadeia produtiva, melhorando a atividade fisiológica das sementes, o crescimento das plantas e a oferta do feijão no mercado (CARVALHO *et al.*, 2014). Esses produtos atuam por meio de transtornos digestivos e ações neurotóxicas, envenenando o sistema nervoso dos insetos-praga, sendo perigoso para todos os animais, incluindo os humanos (COSTA *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2012). Dentre as classes de compostos, existem os inseticidas organofosforados e carbamatos, os piretróides e algumas classes mais recentes, como os neonicotinóides (SPARKS; NAUEN, 2015; MOREIRA *et al.*, 2012).

1.2.1 Inseticidas neonicotinóides

Os neonicotinóides constituem uma classe recente de inseticidas que adquiriu vasta utilização devido à sua baixa toxicidade ($DL_{50} = 470-2000 \text{ mg kg}^{-1}$), maior seletividade aos

insetos e maior rendimento, podendo ser aplicados em pequenas concentrações (MOREIRA *et al.*, 2012). Essas moléculas são derivadas da nicotina, um antigo inseticida que perdeu aplicação por atingir o sistema nervoso de mamíferos e apresentar baixa eficácia. Os mecanismos de ação nos organismos-alvo é o que diferencia os neonicotinoides e a nicotina, pois os neonicotinoides não apresentam protonação em pH fisiológico (7,40 aproximadamente), diferentemente da nicotina conforme apresentado pela Figura 1. Isso ocorre devido às constantes de dissociação ácida uma vez que a nicotina apresenta pKa (8,02) próximo ao pH do meio e os neonicotinoides, por exemplo o tiametoxam, possui pKa igual à 0,79 encontrando-se em sua forma molecular em pH fisiológico (BARCELLOS, 2012; MESQUITA, 2012; OLIVEIRA, 2007). Assim, nessas condições a espécie protonada estabelece interações com os receptores biológicos dos mamíferos, atingindo seu sistema nervoso e provocando a morte (MESQUITA, 2012).

Figura 1- Estrutura química da nicotina protonada em pH fisiológico (7,40).



Fonte: (MESQUITA, 2012).

Há evidências de que a nitiazina teria sido a primeira substância produzida com a finalidade de substituir a nicotina, mas não foi comercializada e, então, serviu como exemplar para as demais. Assim, somente em meados de 1990 começaram a surgir os primeiros produtos, alavancando as vendas pela relevância comercial que o imidacloprido apresentou. A partir de então, outros inseticidas da classe foram sendo desenvolvidos, como a acetamiprida, tiacloprida, dinotefuran, nitempiram, tiametoxam e clotianidina, tornando-se os agrotóxicos mais vendidos no mercado global (QUEIROZ; SILVA, 2021).

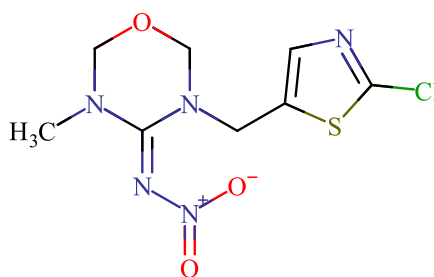
Os neonicotinoides possuem moderada toxicidade oral, apresentando dose letal (DL₅₀) próxima a 470-2000 mg kg⁻¹, de modo que as suas propriedades toxicológicas são semelhantes aos piretróides, contendo seletividade aos insetos e não aos mamíferos (MOHAMED *et al.*, 2009). Especificamente, inseticidas como o tiametoxam apresentam possíveis efeitos

carcinogênicos para os organismos que o consomem acima da dose determinada, porém, devido à miscibilidade em água, este pode ser eliminado através da urina (MESQUITA, 2012).

O mecanismo de ação desses inseticidas ocorre com o ataque ao sistema nervoso dos insetos-praga. O sistema nervoso emite informações ao corpo utilizando-se dos processos referentes aos impulsos nervosos, sendo estes um dos responsáveis pelo movimento dos seres humanos (MESQUITA, 2012). A acetilcolina é um neurotransmissor produzido no sistema nervoso por meio da reação entre a acetilcoenzima A (Acetil-CoA) e a colina, a qual atua como uma espécie de mensageiro entre os neurônios, possuindo ações excitatórias como também, inibitórias. Assim, os impulsos elétricos são atingidos a partir dessa molécula, gerando os sinais para os sistemas nervoso, respiratório, muscular e outros. Em virtude disso, os inseticidas neonicotinoides ocupam os sítios dos receptores da acetilcolina, na membrana pós-sináptica, promovendo a hiperatividade do sistema nervoso e, conseqüentemente, o colapso e a morte dos insetos-praga (MOREIRA *et al.*, 2012; MESQUITA, 2012).

Dentre os principais inseticidas da classe dos neonicotinoides está o tiametoxam, também conhecido como (EZ)3-(2-cloro-tiazol-1,3-tiazol-5-metil)-5-metil-1,3,5-oxadiazinan-4-ilideno(nitro)-amina (Figura 2) e que apresenta toxicidade mediana com classificação toxicológica III (MATTOS *et al.*, 2015; IUPAC, 2015).

Figura 2- Estrutura química do tiametoxam.



Fonte: (IUPAC, 2015).

Esse inseticida possui o poder de agir contra os insetos-praga através da ingestão ou contato, possibilitando a sua aplicação por meio do tratamento de sementes, bem como pela pulverização. A vantagem no tratamento das sementes com o tiametoxam está no fato de que ativa muitas funções fisiológicas das plantas, a exemplo, a geração de proteínas que auxiliam nos mecanismos de defesa, podendo suportar estresses hídricos, irregularidade nutricional bem como, principalmente, o ataque dos insetos-pragas. Além disso, plantas de feijão provenientes de sementes tratadas com tiametoxam, por exemplo, apresentam níveis de clorofila maiores

quando comparados às sementes não tratadas, o que se torna de grande importância, já que essa substância garante o processo fotossintético relevante para a vida vegetal e animal (ALMEIDA, 2012).

O destaque desse inseticida é que possui rápida absorção pelas plantas e aglomera-se nas folhas, apresentando o transporte fortemente através do xilema e, em menores proporções, via floema. Os neonicotinoides, como o tiametoxam, persistem por dois dias nas plantas se for exposto diariamente a 6 horas de sol. No entanto, apresenta duração de 28 dias em altas concentrações no solo pós-semeadura (LABINAS, 2002; MATTOS *et al.*, 2015). Dessa maneira, o tiametoxam é ambientalmente perigoso, visto que o grau de periculosidade desse inseticida é o I, ou seja, demonstra grande risco ao meio ambiente, atacando animais aquáticos, pois persiste no ambiente devido à alta solubilidade em água e pequena sorção no solo (MATTOS *et al.*, 2015). Além disso, essas moléculas podem ser arrastadas pelo ar quando pulverizadas nas lavouras, o que pode comprometer a vida das espécies presentes nesses ambientes, justamente porque esses compostos também apresentam atividades em grupos não-alvos (MESQUITA, 2012).

1.3 Métodos de preparação de amostra

O inseticida tiametoxam atua de forma eficaz no combate aos insetos-pragas, entretanto, é importante que esta substância seja degradada completamente na planta do feijão. Contaminações nas sementes do feijão podem provocar sérias complicações aos organismos humanos, possuindo o limite máximo de resíduos (LMR) de $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ de alimento (FAO, 2019). Com isso, torna-se necessário o controle do tiametoxam nessa cultura, por meio de métodos e técnicas efetivas para a determinação do composto nas amostras de interesse, a fim de avaliar sua ação, bem como o perigo de contaminação das plantas e grãos com os seus resíduos.

Inicialmente, realiza-se o tratamento das amostras de forma a estarem adequadas para as análises instrumentais. Após a colheita, as amostras são encaminhadas ao processo de preparação, no qual ocorre a extração do analito para posterior quantificação, realizada normalmente através de uma técnica cromatográfica, como a cromatografia líquida de alta eficiência ou a cromatografia gasosa (ZHANG; LIN; YE, 2018).

Existem diversos métodos de preparação de amostra que possibilitam a retirada do inseticida da amostra. Os métodos de preparo de amostras são de extrema importância, pois, convertem uma amostra de matriz complexa em um extrato adequado para análise. No entanto,

nos últimos anos, a extração de agrotóxicos tais como o tiametoxam possuem destaque em amostras de solo e água, pouco se encontrando relatos sobre as amostras alimentícias ou plantas. Desde muito tempo, a extração dos analitos decorre de etapas tediosas e morosas, consumindo-se uma grande quantidade de solventes orgânicos e extrações repetitivas. Assim, houve-se a necessidade de aprimoramento nos métodos de preparação de amostra para formas miniaturizadas, simplificadas e ambientalmente seguras (MANSUR, 2013).

Dentre os métodos de preparação de amostra que atendem a esses requisitos e que vêm sendo mais empregados estão o QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*) e a extração sólido-líquido com partição à baixa temperatura (ESL-PBT) para uma variedade de alimentos (BITTENCOURT, 2008; COSTA, 2011; PUSSENTE, 2008; SOARES, 2011; MORAIS *et al.*, 2014; MANSUR, 2013). O método QuEChERS demonstra boa eficiência de extração, é viável economicamente, bem como o tempo para o processo é relativamente curto e de fácil manipulação (PRESTES *et al.*, 2009). Porém, quando comparado a outros métodos, torna-se tedioso devido a existência de várias etapas (FERREIRA, 2019). Já o método da extração sólido-líquido com partição à baixa temperatura se destaca por possuir menor número de etapas no preparo da amostra, propiciando baixa manipulação da amostra pelo analista, rapidez e consumo reduzido de solventes orgânicos (COSTA, 2011). Além disso, um estudo comparativo demonstrou que o método ESL-PBT apresenta resultados muito semelhantes àqueles obtidos pelo método QuEChERS (MANSUR, 2013), sendo, portanto, mais viável. Por este motivo, buscou-se na extração sólido-líquido com partição à baixa temperatura uma metodologia de baixo custo, simples e eficiente para determinação de resíduos de tiametoxam de amostras de folhas de feijão.

1.3.1 Extração sólido-líquido com partição à baixa temperatura

O método de preparação de amostra por extração sólido-líquido com partição à baixa temperatura é amplamente empregado na preparação de amostras alimentícias devido ao simples manuseio, pouca interferência do analista, assim como menor uso de solventes, também menos tóxico e com número reduzido de etapas no processo de extração. A ESL-PBT consiste, inicialmente, na definição do tamanho da amostra sólida com consequente adição de água e um solvente orgânico adequado, com densidade e temperatura de fusão menores que da água; o solvente orgânico deve permanecer na fase superior da mistura para melhor recuperação do extrato após a etapa de congelamento. Posteriormente, o sistema é submetido à agitação e encaminhado ao freezer. Após um determinado período de tempo, a fase aquosa (FA) inferior é

congelada e, portanto, a fase orgânica (FO) líquida superior é retirada para análise instrumental (PUSSENTE, 2008).

Bons resultados de eficiência, notados pela validação do método, são obtidos quando o preparo de amostra é realizado pela ESL-PBT. Na literatura, a ESL-PBT já foi aplicada em amostras de vários alimentos, como a batata, o abacaxi, a uva, a maçã e o alface (BITTENCOURT, 2008; PUSSENTE, 2008; SOARES, 2011; COSTA, 2011; MORAIS *et al.*, 2014; MANSUR, 2013). Em todos esses estudos, o método demonstrou boas porcentagens de recuperação, as quais variam entre 60 % e 90 %, dependendo da amostra, além de boa detectabilidade, já que os limites de quantificação e de detecção se apresentaram abaixo do limite máximo de resíduos nos alimentos (BITTENCOURT, 2008; PUSSENTE, 2008; SOARES, 2011; COSTA, 2011; MORAIS *et al.*, 2014; MANSUR, 2013).

1.4 Técnicas analíticas

As amostras de alimentos geralmente são complexas, possuindo componentes da própria matriz que podem interferir no sinal da substância de interesse, o analito (FERREIRA, 2019). Assim, torna-se necessária a aplicação de uma técnica de separação eficiente que permita a diferenciação dos sinais do analito e de interferentes para posterior quantificação do analito com precisão e exatidão (SKOOG *et al.*, 2008). Neste contexto, destacam-se as técnicas cromatográficas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou a cromatografia gasosa (CG).

A cromatografia é uma técnica de separação físico-química, que se baseia nas interações dos componentes da amostra com as fases móvel e estacionária (HOLLER; SKOOG *et al.*, 2009). Em síntese, a amostra é carregada por uma fase móvel (FM) através de uma coluna contendo a fase estacionária (FE), onde ocorrem equilíbrios dinâmicos entre os analitos e as fases. Neste processo, os compostos que interagem mais fracamente com a FE eluem mais rapidamente, enquanto aqueles que interagem mais fortemente ficam mais tempo retidos. Desse modo, os tempos de retenções diferentes das substâncias de uma amostra é o que caracterizam a separação, bem como possibilitam a análise quantitativa de cada componente individualmente (SKOOG *et al.*, 2009).

Dentre as técnicas cromatográficas mais empregadas atualmente para a separação e quantificação de agrotóxicos estão a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). De modo geral, a cromatografia gasosa se define pela aplicabilidade em análises de amostras voláteis, volatilizáveis ou derivatizáveis que sejam, *a priori*,

termicamente estáveis (SKOOG *et al.*, 2009; SOARES, 2011). Já a CLAE é a técnica mais empregada para separação, pois, abrange uma vasta gama de substâncias com polaridades distintas, termicamente instáveis e não-voláteis (SKOOG *et al.*, 2009; FERREIRA, 2019). Comparativamente, a CLAE com detector de absorvância apresenta melhor detectabilidade, em relação à CG com detecção por ionização em chama ou por captura de elétrons, frente à análise de inseticidas neonicotinoides. O tiametoxam, por exemplo, resulta em picos assimétricos quando analisado por cromatografia gasosa devido à baixa volatilidade do composto (OBANA *et al.*, 2003; MANSUR, 2013). Alguns estudos indicaram boas faixas de recuperação para outros compostos, em análise por CG exceto para o tiametoxam, bem como se observou grandes efeitos matriz nas amostras avaliadas (SOARES, 2011; COSTA, 2011). Com isso, a cromatografia líquida de alta eficiência apresenta melhor detectabilidade e resolução para o tiametoxam em amostras alimentícias, sendo, portanto, a técnica analítica selecionada para este trabalho.

1.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica analítica de separação aprimorada e bastante empregada desde meados dos anos 70 (FERREIRA, 2019). A CLAE se apresenta como um processo de separação rápido, eficiente e de alta resolução (FREITAS, 2019), muito utilizada nas indústrias atualmente. A separação físico-química ocorre através das diferenças de interações do analito com as fases móvel e estacionária; sendo esta, encontrada dentro da coluna cromatográfica como um líquido orgânico recobrando, através de ligações covalentes, um suporte sólido inorgânico. A fase móvel, por sua vez, é constituída de um solvente ou uma mistura de solventes líquidos e é bombeada por uma bomba de alta pressão (SKOOG *et al.*, 2009). A amostra é introduzida na coluna cromatográfica através de uma válvula de injeção, sendo transportada pela FM que carrega os componentes da amostra através da FE. Após eluirm, os compostos da amostra são encaminhados ao sistema de detecção de forma individualizada devido à separação entre as duas fases, gerando sinais que viabilizam suas quantificações pela medida da área dos picos gerados (FERREIRA, 2019; SKOOG *et al.*, 2009; FREITAS, 2019).

Entre os detectores acoplados à CLAE para análises de agrotóxicos em matrizes alimentícias, o detector por arranjo de diodos (DAD) merece destaque. Isto porque o DAD possibilita uma varredura espectral que fornece a pureza do pico do analito e auxilia na identificação do mesmo, através da consulta a uma biblioteca de espectros, além da

quantificação eficiente dos compostos (CALDAS *et al.*, 2011; FERREIRA, 2019). Extratos de amostras de alimentos, como leite, mel, caldo de cana-de-açúcar e batata foram analisadas perante a técnica de CLAE-DAD e observaram-se boa seletividade para o inseticida tiametoxam (SAMPAIO *et al.*, 2012; ABD-ALHRAMAN, 2014; SECCIA *et al.*, 2008). Assim, a CLAE-DAD é uma técnica adequada para a análise de tiametoxam em folhas de feijão.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal desse trabalho é desenvolver uma metodologia para determinação de tiametoxam em folhas de feijoeiro empregando a extração sólido-líquido com partição à baixa temperatura e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos.

Para alcançar o objetivo geral do trabalho as seguintes etapas foram desenvolvidas:

- ✓ Otimização do método ESL-PBT para extração do tiametoxam em folhas de feijoeiro, avaliando-se a massa de amostra de folhas, o volume e o tipo de solvente e o tempo de congelamento;
- ✓ Desenvolvimento de um método de análise por CLAE-DAD para quantificação seletiva de tiametoxam nas folhas do feijoeiro;
- ✓ Validação da metodologia para a determinação de tiametoxam em folhas do feijoeiro, empregando a ESL-PBT e a CLAE-DAD;

3 METODOLOGIA

A determinação de resíduos de tiametoxam em folhas de feijoeiro foi realizada a partir da extração sólido-líquido com partição à baixa temperatura seguida da quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjos de fotodiodos.

3.1 Materiais, solventes e reagentes

Os materiais, solventes e reagentes empregados para a otimização do método de ESL-PBT de tiametoxam das folhas de feijão foram: Tiametoxam (Lianyungang Avilive Chemical, 98,21 %); acetato de etila, grau cromatográfico 99 % (ECIBRA, Santo Amaro, Brasil); acetona, P.A. 99,5 % (IMPEX, Barcelona, Espanha); acetonitrila, grau cromatográfico 99,9 % (Tedia e Êxodo Científica) e metanol, grau cromatográfico 99,5 % (J.T. BAKER, São Paulo, Brasil); estufa (Biopar, modelo S150BA, Porto Alegre, Brasil); tubo Falcon de 15 mL; balança eletrônica com precisão 0,001 g (Acculab, Bradford, MA, EUA); balança analítica de 0,0001 g (Acculab, Bradford); tubos flaconetes de 10 mL; espátulas metálicas; mixer caseiro; béqueres de 25 e 50 mL; micropipetas (0,5 a 10 μ L, 10 a 100 μ L, 100 a 1000 μ L e 1000 a 5000 μ L); agitador vórtex (ARSEC modelo TS200, São Paulo, Brasil); centrífuga (Celm, modelo combate, São Caetano do Sul, Brasil); água ultrapurificada com resistividade maior que 18,2 M Ω cm em purificador MegaPurity modelo MEGA RO/UP (Rio de Janeiro, Brasil), e; freezer Consul modelo Bem Estar CRM55, para a partição em baixa temperatura.

Para a preparação da fase móvel, foram utilizadas membranas de Nylon® (Millipore®, Millford, CT, EUA) para filtração com porosidade de 0,22 μ m e diâmetro de 45 mm; sistema de filtração de fase móvel; funil de placa sinterizada; bomba de vácuo (Primatec, modelo 122 BCP, Itu, Brasil); kitassato de 500 mL, e; banho ultrassom (Quimis, Diadema, Brasil). A composição da fase móvel foi água ultrapurificada e metanol, reagente com grau cromatográfico de 99,5 % (J.T. Baker).

3.2 Análises cromatográficas

As análises dos extratos orgânicos e soluções dos padrões do tiametoxam foram realizadas em um cromatógrafo a líquido com sistema quaternário de bombeamento da marca Waters, modelo Alliance e2695, módulo automático de injeção com carrossel para 120 amostras e detectores por arranjo de fotodiodos e índice de refração (Milford, EUA). A coluna utilizada

na separação foi uma coluna XSelect recheada com fase C₁₈ HSS (150 mm × 4.6 mm, com partículas de 3,5 µm de d.i.) da Waters. A determinação do teor recuperado do tiametoxam das folhas de feijoeiro foi obtida a partir da construção de curvas analíticas preparadas pelo método do padrão externo (em solvente). As condições de análise foram: composição da fase móvel metanol:água (30:70, v/v), com uma vazão da FM de 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção de 10 µL, detecção DAD a 254 nm e temperatura do forno da coluna de 35 °C.

3.3 Obtenção das amostras de folhas do feijoeiro

As amostras de folhas de feijoeiro foram coletadas de experimento de plantio, isentas do inseticida, realizado na Casa de Vegetação instalada no *campus* Pontal da Universidade Federal de Uberlândia. As coletas das folhas ocorreram periodicamente a cada 7 dias e foram armazenadas em freezer a -15 °C até o momento da análise.

3.3.1 Processamento das amostras

As folhas do feijoeiro foram lavadas com água ultrapura e secas em estufa por 12 h a 40 °C. Em um mixer, devidamente higienizado, as folhas foram trituradas até que se obtivesse uma massa homogênea. A amostra triturada foi retirada do mixer e armazenada em frasco apropriado em geladeira a 8 °C até o momento do uso.

3.4 Preparação das soluções padrão de tiametoxam

Uma solução estoque de tiametoxam foi preparada em balão volumétrico de 10 mL a partir da dissolução de 0,01000 g em acetonitrila, de forma a obter uma concentração de 1000 mg L⁻¹. As soluções foram preparadas em acetonitrila com o objetivo de garantir maior estabilidade do inseticida ao longo do uso, evitando-se a degradação em curto espaço de tempo. Com isso, a solução estoque foi transferida para um frasco flaconete de vidro de 10 mL. Essa solução foi armazenada em freezer a -4 °C e, a partir dela, foi preparada uma solução de trabalho do tiametoxam na concentração de 100 mg L⁻¹.

3.5 Preparação da curva analítica

A curva analítica utilizada no estudo de otimização foi preparada nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 8,0 e 10,0 mg L⁻¹ de tiametoxam em metanol. As soluções foram analisadas por cromatografia sob as condições de análise cromatográfica otimizadas, descritas na seção 3.2.

3.6 Otimização da ESL-PBT de tiametoxam de amostras de folhas de feijoeiro

Primeiramente, foi realizado um procedimento geral para a análise da eficiência de extração do tiametoxam da amostra fortificada. Com isso, em tubos Falcon de 15 mL foram adicionados 100 mg de folhas de feijão trituradas, sendo fortificadas com a solução estoque de tiametoxam a 1000 mg L⁻¹, aguardando por 5 min para interação do composto com a amostra. As fortificações das folhas foram realizadas de forma a obter uma concentração de 100,0 µg g⁻¹ do inseticida na porção da amostra. Logo após, foram adicionados 2 mL de água ultrapura, deixando em contato por 2 min. Em seguida, foram acrescentados 4 mL de solvente orgânico (acetato de etila) ao tubo e a mistura foi agitada em vórtex por 1 min. Devido à existência de folhas de feijão na parte superior da mistura, a mesma foi centrifugada a 3000 RPM por 3 min. Por fim, o tubo foi levado ao freezer e mantido por 4 h, sendo coletado 1 mL do extrato orgânico não congelado após este período. Esta alíquota foi filtrada e transferida para um vial e injetada no sistema cromatográfico sob as condições de análise otimizadas. Todo o processo foi realizado em triplicata.

O método ESL-PBT dos resíduos de tiametoxam em amostras de folhas de feijoeiro foi otimizado a fim de obter o máximo de recuperação dos resíduos do inseticida das amostras. Desta forma, algumas variáveis foram avaliadas durante o desenvolvimento do método, tais como: tipo de solvente extrator, massa da amostra, tempo de congelamento da amostra, proporção dos volumes de água e de solvente extrator.

3.6.1 Avaliação do solvente extrator

O procedimento descrito no item 3.6 foi repetido, em triplicata, porém, empregando outros diferentes solventes, tais como acetonitrila, acetato de etila, metanol e acetona, de maneira a avaliar o melhor solvente extrator para extrair o tiametoxam das amostras de folhas de feijão.

3.6.2 Massa da amostra

Após a escolha do solvente extrator, foram avaliadas as massas de amostra de folhas de feijão a fim de dimensionar o método ESL-PBT para a obtenção da máxima eficiência de extração dos resíduos do tiametoxam. Para isso, foram analisadas as massas de 50, 100 e 250 mg mantidas sob as mesmas condições de análise e utilizando o solvente extrator escolhido em 3.6.1.

3.6.3 Proporção dos volumes de água e de solvente extrator

Após otimizados o solvente extrator e a massa da amostra de folhas de feijão empregados na ESL-PBT, prosseguiu-se à avaliação da proporção dos volumes de água e de solvente extrator que apresentasse a melhor partição do analito da amostra para tal solvente. Assim, foram estudadas as proporções 1:2 (v/v) de água:solvente extrator, sendo avaliados os volumes de 2,0:4,0; 3,0:6,0 e 4,0:8,0 (mL:mL).

3.6.4 Tempo de congelamento

Com a otimização do solvente extrator, massa da amostra e proporção dos volumes de água e solvente, o tempo de congelamento se tornou objeto de estudo para verificação do menor tempo necessário para o congelamento da fase da amostra e a consequente partição do tiametoxam para o solvente orgânico. Foram estudados os tempos de congelamento da amostra de 120, 240, 360 e 480 minutos.

3.7 Validação da metodologia de determinação do tiametoxam das folhas de feijoeiro

A validação é um conjunto de procedimentos que visam confirmar o desempenho da metodologia analítica para ser aplicada à finalidade desejada, i.e., a extração de resíduos de tiametoxam das folhas de feijão. Os parâmetros analíticos que foram validados compreendem a seletividade, o limite de detecção (LOD, *limit of detection*), o limite de quantificação (LOQ, *limit of quantification*), a linearidade, a faixa dinâmica linear, a sensibilidade, o efeito matriz, a precisão, a exatidão e a robustez do método. Dessa forma, o documento selecionado para essa orientação foi o SANTE/11312/2021, 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 (SANTE, 2022).

3.7.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada mediante a comparação do pico do tiametoxam, no tempo de retenção do inseticida, nos cromatogramas dos extratos da ESL-PBT de amostra de folhas fortificada e amostra isenta de tiametoxam. Os extratos foram obtidos empregando a proporção de 2,0:4,0 mL do volume entre água:acetonitrila, 100 mg de amostra e 4 h de congelamento e as análises foram realizadas nas condições cromatográficas otimizadas.

3.7.2 Linearidade

Para o estudo da linearidade do método foi preparada uma solução padrão 1000 mg L⁻¹ de tiametoxam, inicialmente. A partir desta solução estoque, preparou-se uma solução de trabalho a 10 mg L⁻¹, sendo empregada para a diluição consecutiva de modo a obter outras soluções nas concentrações de 7,50; 5,00; 2,50; 1,00; 0,50; 0,25 mg L⁻¹. Como foram preparados 5,0 mL de cada solução padrão, as demais em menores concentrações foram obtidas pela diluição da solução a 1,00 mg L⁻¹, sendo elas de 0,10; 0,05; 0,01 mg L⁻¹; a solução a 0,01 mg L⁻¹ foi ainda diluída para as concentrações de 0,005 e 0,001 mg L⁻¹. Todas as soluções foram preparadas em acetonitrila e analisadas em duplicata nas condições cromatográficas otimizadas (item 3.2). Por fim, a curva analítica foi construída para a obtenção dos coeficientes de correlação linear (r) e de determinação (R^2), os quais permitem avaliar o caráter linear de resposta do método cromatográfico, de acordo com o guia da Comunidade Europeia (SANTE, 2022).

3.7.3 Limite de quantificação (LOQ)

O limite de quantificação foi determinado através da injeção consecutiva de soluções padrão do tiametoxam no cromatógrafo a líquido, diluídas a partir da solução de trabalho a 10 mg L⁻¹; o processo foi realizado junto ao estudo da linearidade. Dessa forma, o LOQ foi definido como a menor concentração do analito que configurou um pico cromatográfico para o tiametoxam com área repetitiva entre as injeções consecutivas. Para confirmação, a solução padrão na concentração do LOQ foi analisada em triplicata nas condições otimizadas, sendo avaliado o desvio padrão relativo, o qual deve ser inferior a 20 %, segundo o documento

SANTE/11312/2021 (SANTE, 2022). Em relação ao limite de detecção, este foi estimado indiretamente por meio do valor de LOQ (WENZL *et al.*, 2016).

3.7.4 Faixa dinâmica linear

A faixa dinâmica linear ou faixa de trabalho se refere ao intervalo de concentrações do analito cuja concentração esperada na amostra deva estar inclusa. Esse parâmetro foi analisado a partir da construção das curvas analíticas no extrato da matriz de folhas de feijão e em solvente, iniciadas com o limite de quantificação – o primeiro ponto da curva analítica. A curva analítica preparada no extrato foi obtida pela aplicação da ESL-PBT a uma amostra de folhas de feijão isenta de adição do analito para a obtenção de um extrato em branco. Após a etapa de congelamento, 2,0 mL do extrato foram coletados e diluídos em acetonitrila para preparar, diretamente nos vials, soluções de tiametoxam nas concentrações do 1×LOQ, 2×LOQ, 4×LOQ, 10×LOQ, 20×LOQ, 40×LOQ, 60×LOQ, 80×LOQ e 100×LOQ. Em seguida, uma curva analítica similar foi preparada, empregando a acetonitrila como solvente, das soluções padrão de tiametoxam nas concentrações do 1×LOQ, 2×LOQ, 20×LOQ, 40×LOQ, 60×LOQ, 80×LOQ e 100×LOQ. Para ambas as curvas, as soluções foram preparadas a partir de uma solução padrão a 1 mg L⁻¹ de tiametoxam. Desse modo, as curvas analíticas construídas contemplaram o número mínimo de cinco concentrações (pontos) requerido pelo guia de validação (SANTE, 2022).

3.7.5 Sensibilidade

A sensibilidade da metodologia de determinação do tiametoxam em folhas de feijoeiro indica o quanto a resposta analítica varia conforme uma determinada variação na concentração do analito. Portanto, esse parâmetro foi obtido diretamente das curvas analíticas preparadas no extrato e em solvente, uma vez que a sensibilidade corresponde ao coeficiente angular ou inclinação das retas (SANTE, 2022).

3.7.6 Efeito matriz

O efeito matriz indica as potenciais interferências que os compostos da matriz das folhas de feijão possuem no sinal analítico do tiametoxam. Dessa forma, essa figura de mérito foi verificada mediante a comparação, qualitativa, das curvas analíticas obtidas para soluções

padrão do analito preparadas no solvente (acetonitrila) e na matriz das folhas de feijão. O efeito matriz é evidenciado quando há a ausência de paralelismo entre as curvas e, portanto, deve-se empregar a curva na matriz para a quantificação do analito na amostra, como preconizado pelo guia da Comunidade Europeia (SANTE, 2022).

O efeito matriz pode ser quantificado a partir das inclinações das curvas analíticas preparadas no extrato da matriz e em solvente, conforme a Equação 1.

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

Em que: s é o coeficiente angular das equações das retas e os subíndices *matriz* e *solv* se referem, respectivamente, às curvas analíticas preparadas no extrato da matriz e em acetonitrila.

3.7.7 Precisão e exatidão

Para avaliar a precisão e a exatidão da metodologia proposta foram realizados ensaios de adição e recuperação. A precisão foi verificada sob as dimensões de repetibilidade e precisão intermediária (reprodutibilidade dentro do laboratório) do método. Com isso, empregou-se a ESL-PBT de resíduos de tiametoxam das folhas de feijão (procedimento descrito em 3.6 nas condições otimizadas), fortificando a amostra com solução padrão do analito de modo a resultar em uma concentração do inseticida de 5×LOQ e 10×LOQ no extrato. Seguindo o documento SANTE/11312/2021, foram realizadas 6 repetições para cada uma das concentrações estudadas, sendo os procedimentos executados por analistas diferentes em quatro dias distintos. Os extratos obtidos foram analisados sob as condições cromatográficas previamente indicadas. Por fim, a repetibilidade e precisão intermediária foram verificadas pelos cálculos dos desvios padrão relativos (RSD, *relative standard deviation*), o qual deve ser inferior a 20 %, enquanto a exatidão se refere à taxa de recuperação do tiametoxam das folhas de feijão, devendo estar entre 70 e 120 % de acordo com o documento SANTE/11312/2021 (SANTE, 2022).

3.7.8 Robustez

A robustez da metodologia foi avaliada mediante o teste de Youden (YOUTEN; STEINER, 1975), o qual avalia sete variáveis do método em dois níveis cada empregando um planejamento fatorial fracionário 2^{7-4} (SILVA *et al.*, 2023). Assim, o teste de Youden foi aplicado para a avaliação simultânea de 7 variáveis do método de determinação de tiametoxam

em folhas de feijão, em duas condições cada, realizando um total de 8 ensaios. Desse modo, foram empregadas a ESL-PBT do inseticida das folhas de feijão, sendo essas fortificadas com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de tiametoxam. Os extratos obtidos foram analisados sob as condições cromatográficas indicadas anteriormente. A Tabela 1 apresenta a matriz do planejamento de experimentos sugerida pelo teste de Youden para a avaliação da robustez da metodologia desenvolvida neste trabalho. Cada variável foi avaliada no nível otimizado (letras maiúsculas) e em um nível deliberadamente modificado (letras minúsculas), que representa uma hipotética situação em que a condição otimizada do método não possa ser completamente atendida.

Tabela 1- Matriz do planejamento de experimentos para a avaliação da robustez da ESL-PBT de tiametoxam de amostras de folhas de feijão, empregando o teste de Youden.

Fatores	Experimentos								Condições	
	1	2	3	4	5	6	7	8	Otimizadas	Variadas
Volume de solvente	A	A	A	A	a	a	a	a	4,0 mL	4,5 mL
Tempo de congelamento	B	B	b	b	B	B	b	b	2h	2:30h
Massa de amostra	C	c	C	c	C	c	C	c	100 mg	125 mg
Solvente FM (marca)	D	D	d	d	d	d	D	D	Êxodo	Tedia
Vazão	E	e	E	e	e	E	e	E	1 mL min^{-1}	$0,8 \text{ mL min}^{-1}$
FM (ACN)	F	f	f	F	F	f	f	F	30%	32%
Temperatura da coluna	G	g	g	G	g	G	G	g	30°C	32°C

Fonte: Próprio autor.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento do método de quantificação de tiametoxam

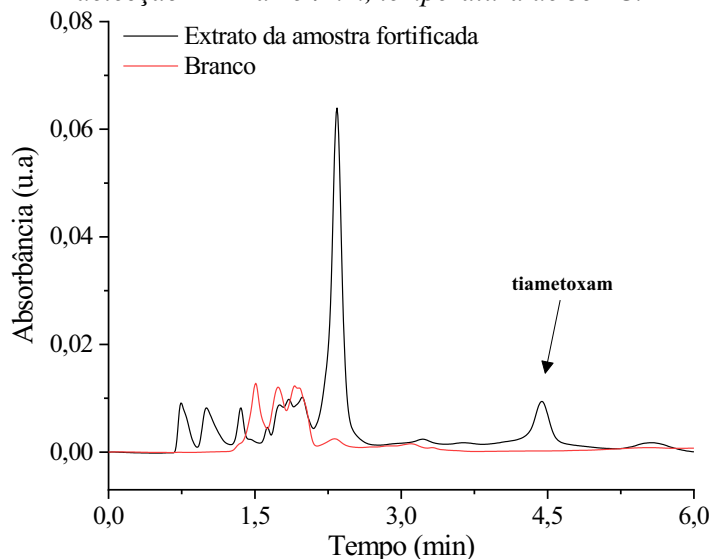
A CLAE é a principal técnica de análise de multirresíduos de agrotóxicos já que permite separar um elevado número de compostos com propriedades físico-químicas variadas. O processo de separação na CLAE envolve a retenção dos componentes de uma amostra através da coluna cromatográfica que são retardados ou acelerados de acordo com as interações físico-químicas específicas desses com a FE e com a FM. O tempo que o analito demora para eluir da coluna depende da natureza da FE e da composição da FM. O tempo que uma substância é eluída é definido como o tempo de retenção daquela substância. O tempo de retenção, sob condições mantidas constantes, é considerado uma característica razoavelmente única de uma dada substância tornando-se útil para a sua identificação, embora este não seja um dos fortes parâmetros da CLAE. A qualidade especial desta técnica, além da separação, é a quantificação precisa e exata dos compostos em uma mistura, que ocorre pela relação linear que existe entre a área do pico e a concentração do analito (COLLINS *et al.*, 2006).

O tiametoxam é definido como uma substância polar já que apresenta hidrofiliabilidade indicada pelo $LogP = -0,13$ (PubChem, 2023). O LogP se refere ao logaritmo de K_{ow} (constante de partição octanol: água), também denominado P-valor, obtido pela razão das concentrações de um soluto na fase octanol e na fase aquosa a uma temperatura específica. O LogP pode variar de -3 (muito hidrofílico) até +10 (extremamente hidrofóbico) (CUMMIN; RÜCKER, 2017). Logo, o LogP de -0,13 indica que é esperada uma maior concentração do tiametoxam na água que no octanol, em função de sua maior afinidade pela fase aquosa. Nesse sentido, como a fase estacionária era constituída de C_{18} , substância altamente apolar, buscou-se a diminuição da força de eluição da FM, aumentando a sua polaridade pela adição de água à mistura com metanol, para que houvesse a eluição do tiametoxam em um tempo de retenção não muito próximo do início do cromatograma, região que normalmente são eluídos constituintes mais polares das matrizes das amostras.

As condições de análise cromatográfica selecionadas para o estudo de otimização da ESL-PBT de tiametoxam em folhas de feijão foram: composição da fase móvel metanol:água (30:70, v/v), vazão da FM de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, volume de injeção de $10 \mu\text{L}$, detecção DAD a 254 nm, coluna cromatográfica XSelect HSS C_{18} e temperatura do forno de coluna de $35 \text{ }^\circ\text{C}$. A identificação do analito nos cromatogramas foi realizada pela comparação do tempo de retenção do pico do tiametoxam nos extratos das amostras com o tempo de retenção do pico do padrão

de tiametoxam, sendo o t_R de 4,35 min. A Figura 3 apresenta os cromatogramas sobrepostos dos extratos orgânicos da amostra fortificada com tiametoxam ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$) e do branco.

Figura 3- Cromatogramas dos extratos obtidos da ESL-PBT de tiametoxam de uma amostra fortificada e do branco. Condições de análise: FM metanol:água (30:70, v/v), vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, detecção DAD a 254 nm , temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$.



Fonte: Próprio autor.

É possível notar na Figura 3 que, na condição cromatográfica definida, foi obtida uma boa separação do pico do tiametoxam dos componentes coextraídos da matriz da amostra, além de se obter um tempo de análise relativamente curto. Vale ressaltar que embora sejam extratos obtidos de uma mesma amostra sob as mesmas condições, verifica-se uma diferença na intensidade dos picos dos coextrativos comparando os dois cromatogramas. Isso está relacionado ao fato de que os extratos não se referem exatamente à mesma porção da amostra de modo que os compostos presentes são extraídos de maneiras diferentes. Independente disso, nenhum interferente da matriz das folhas elui no mesmo tempo que o tiametoxam. Portanto, essas condições cromatográficas foram selecionadas para as análises dos extratos da ESL-PBT de tiametoxam das folhas de feijão.

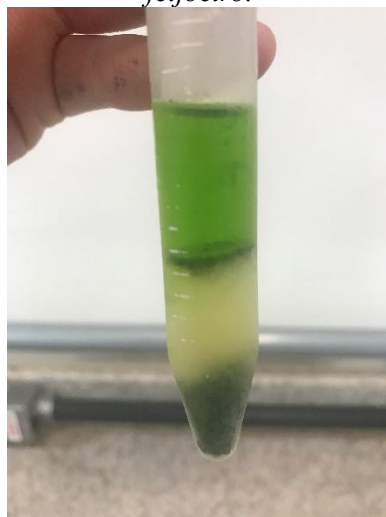
4.2 Otimização da ESL-PBT de tiametoxam de folhas de feijoeiro

A extração de agrotóxicos de amostras diversas têm sido objeto de estudo de vários autores ao longo dos anos. Uma preparação da amostra que seja eficiente, economicamente viável, de rápida e simples execução e, principalmente, ambientalmente segura tem sido o foco das análises de resíduos de agrotóxicos nestas amostras. Para o presente estudo, a ESL-PBT foi

o método de preparo de amostras selecionado, pois atende aos critérios indicados, além de apresentar boas taxas de recuperação e repetibilidade nas extrações de inseticidas (COSTA *et al.*, 2015; MORAIS *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2017). Para extrair de forma eficiente o tiametoxam das folhas de feijão foram otimizadas quatro condições do método ESL-PBT: o solvente extrator, a massa da amostra, a proporção de volumes de água e solvente extrator e o tempo de congelamento.

Inicialmente, foi empregada uma proporção 1:1 (v/v) de água e solvente extrator, sendo utilizados 4,0 mL de água ultrapura e 4,0 mL de solvente extrator. Foram avaliados como solventes extratores metanol, acetato de etila, etanol e acetona. Nestas condições, as amostras não congelaram dentro do período de congelamento estudado. Assim, uma proporção de 1:2 (v/v) de água e solvente extrator foi avaliada, uma vez que na literatura essa condição é indicada como ideal para a ESL-PBT de agrotóxicos de amostras de solo e água (VIEIRA, 2005) e de amostras de alimentos e bebidas (GOULART, 2010; CARDOSO, 2019). As Figuras 4 e 5 apresentam, respectivamente, fotos da separação das fases aquosa congelada (inferior) e orgânica líquida (superior) após a etapa de congelamento e os extratos orgânicos coletados em *vials* após a separação das fases.

Figura 4- Imagem da separação das fases aquosa e orgânica na ESL-PBT de tiametoxam de folhas de feijoeiro.



Fonte: Próprio autor.

Figura 5- Imagem dos extratos da ESL-PBT de tiametoxam de folhas de feijão.



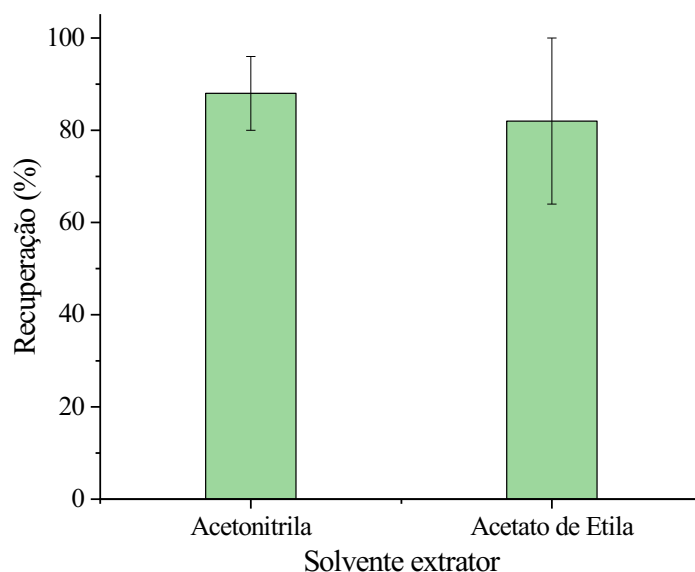
Fonte: Próprio autor.

4.2.1 Avaliação do solvente extrator

Para a ESL-PBT de resíduos de tiametoxam das folhas de feijoeiro, a escolha do solvente extrator é de suma importância, tanto para a seletividade da extração quanto para uma recuperação máxima do inseticida da amostra. Assim, foram avaliados quatro solventes extratores: metanol, acetonitrila, acetato de etila e acetona. Esses solventes foram escolhidos por apresentarem temperaturas de fusão e densidades inferiores às da água, além de apresentarem miscibilidade total em água, viabilizando a partição do analito a partir do congelamento da fase aquosa.

Em um primeiro momento, foram verificados os solventes acetonitrila, acetato de etila, metanol e acetona para o processo de ESL-PBT, na proporção de volume 2,0:4,0 mL de água: solvente, utilizando a massa da amostra de 100 mg e 4 h de congelamento. Os extratos empregando a acetona e o metanol como extratores não resultaram em separação de fases, pois não houve o congelamento da amostra. Desta forma, a acetona e o metanol foram eliminados do estudo, sendo analisados apenas os extratos em acetonitrila e acetato de etila. A Figura 6 apresenta as porcentagens de recuperação do tiametoxam das folhas de feijoeiro, empregando estes dois solventes.

Figura 6- Porcentagens de recuperação do tiametoxam das folhas de feijoeiro pela ESL-PBT, empregando os solventes acetonitrila e acetato de etila.



Fonte: Próprio autor.

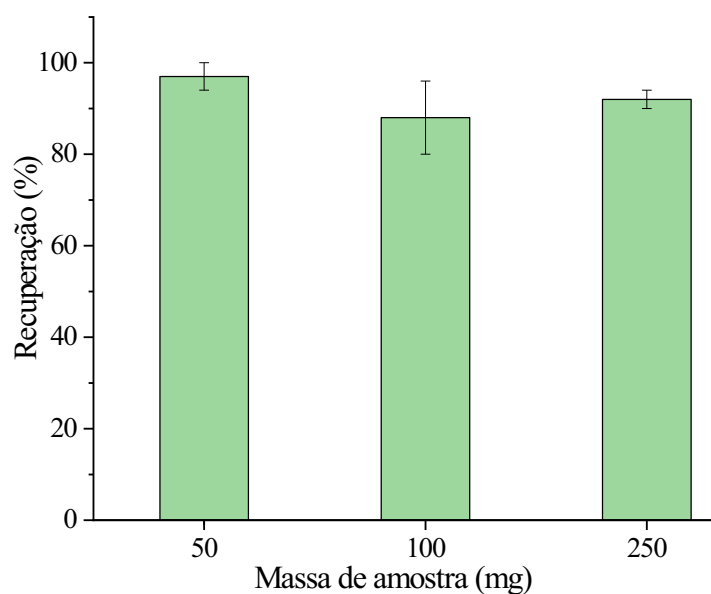
Conforme disposto na Figura 6, a acetonitrila apresentou uma taxa de recuperação semelhante ao acetato de etila, já que estatisticamente não há diferença entre os valores. A acetonitrila (ACN) é um dos solventes mais empregados para extração de agrotóxicos, pois apresenta compatibilidade com a fase móvel da CLAE além das características químicas adequadas para análises de substâncias de polaridades variadas (SANTANA, 2017; PINHO, 2007). Outra qualidade deste solvente é o fato de extrair poucos interferentes lipofílicos das matrizes das amostras em comparação aos demais solventes, como a acetona e o acetato de etila, utilizados neste trabalho (MASTOVSKÁ, LEHOTAY, 2004). A acetonitrila apresentou ótimos resultados para extração de agrotóxicos em batata (RIGUEIRA *et al.*, 2013), em água e solo (VIEIRA 2005; VIEIRA *et al.*, 2007; MESQUITA *et al.*, 2015), em banana prata (CARDOSO, 2019) e em cajá-manga (SANTANA, 2017).

Os cromatogramas provenientes das análises dos extratos em acetato de etila apresentaram picos de alta intensidade para o extrator, registrados no início do cromatograma, além de picos do tiametoxam com ombros e forte influência de coextrativos das folhas de feijoeiro, o que impossibilitou a quantificação do tiametoxam de forma confiável. Portanto, o solvente selecionado para a ESL-PBT de tiametoxam em folhas de feijoeiro foi a acetonitrila.

4.2.2 Massa da amostra

A massa de amostra foi o segundo fator estudado para a otimização da ESL-PBT. A quantidade da amostra foi avaliada para o dimensionamento do método em função da disponibilidade de amostra, uma vez que a planta pode não se desenvolver adequadamente e produzir folhas pequenas ou não as produzir em quantidade suficiente para aplicação do método. Com base nisso, massas de folhas de feijão inferiores a 1,000 g foram estudadas, uma vez que a amostra apresenta baixa densidade e massas maiores demandariam grandes volumes de solvente extrator para um processo de partição mais eficiente. Na Figura 7 são apresentadas as porcentagens de recuperação do tiametoxam em função das diferentes massas de folhas de feijoeiro avaliadas.

Figura 7- Porcentagens de recuperação do tiametoxam das folhas de feijoeiro pela ESL-PBT em função da massa das amostras de 50, 100 e 250 mg.



Fonte: Próprio autor.

Conforme apresentada na Figura 7, as massas da amostra de folhas estudadas favoreceram a extração do tiametoxam e não se diferiram estatisticamente com relação às taxas de recuperação, entre 88,0 % e 97,0 %. Embora a maior taxa de recuperação absoluta tenha sido obtida com a massa de 50 mg, a menor massa de folhas apresentou maior dificuldade de decantação durante a etapa de congelamento, requerendo uma etapa de centrifugação mais demorada, aumentando o tempo de preparo de amostra.

De maneira semelhante, os resultados obtidos para a massa de 250 mg de folhas empregada na ESL-PBT de tiametoxam demonstraram bons valores de taxa de recuperação do

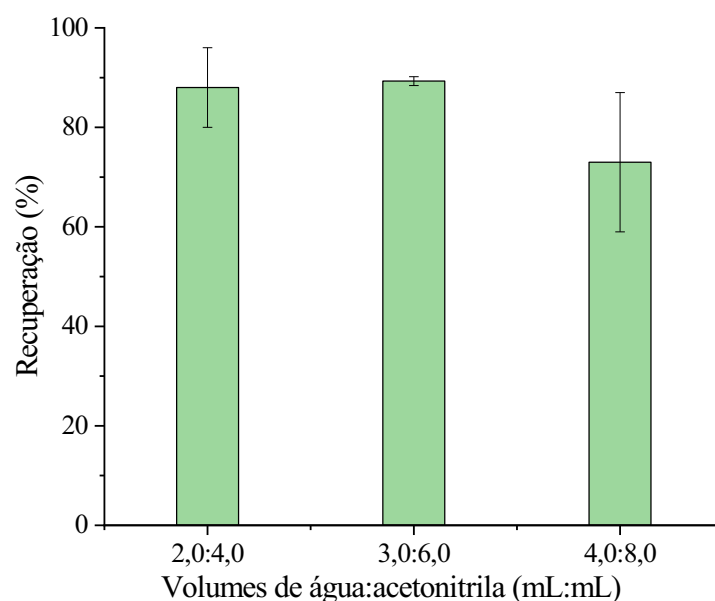
inseticida e, conseqüentemente, uma boa extração. Contudo, a análise da amostra isenta do analito constatou a eluição conjunta de outras substâncias com o tiametoxam, visto que o cromatograma apresentou picos com ombro no tempo de retenção do analito, nesta situação. Ou seja, elevadas massas podem proporcionar a extração de maiores quantidades de componentes da matriz da amostra, os quais interfeririam na quantificação do mesmo.

Algumas matrizes já estudadas na literatura contaram com massas de amostra acima de 1,000 g, como a ESL-PBT de agrotóxicos de polpa de cajá-manga, maçã, banana prata, solo e mel (SANTANA, 2017; PUSSENTE, 2008; CARDOSO, 2019; MESQUITA *et al.*, 2015; SILVA, 2020). Uma massa de 100 mg de amostra foi empregada no estudo de extração de resíduos de fipronil de cascas de ovos, empregando o método ESL-PBT (OTAVIANO, 2022). Portanto, é possível notar que a massa é um parâmetro relativo à cada tipo de amostra. Então, para a ESL-PBT de tiametoxam de amostras de folhas de feijoeiro, a massa escolhida foi de 100 mg, visto que apresentou resultados estatisticamente similares aos demais e, principalmente, por facilitar a pesagem e o congelamento, empregando um menor tempo no preparo da amostra.

4.2.3 Volumes de água e solvente extrator

A proporção dos volumes de água e solvente extrator foi outra variável do método ESL-PBT estudada, haja vista que o analito é particionado entre as duas fases, aquosa e orgânica, portanto, podendo afetar a eficiência da extração do tiametoxam. Como já mencionado, a proporção 1:2 (v/v) demonstra maiores eficiências de extração de resíduos de agrotóxicos na literatura. Dessa forma, esta proporção foi fixada avaliando diferentes volumes de água e de acetonitrila na ESL-PBT de tiametoxam de folhas de feijoeiro, 2,0:4,0; 3,0:6,0 e 4,0:8,0 mL. As porcentagens de recuperação do tiametoxam empregando os diferentes volumes de água e solvente extrator estão apresentados na Figura 8.

Figura 8- Porcentagens de recuperação de tiametoxam das folhas de feijoeiro pela ESL-PBT empregando diferentes combinações de volumes de água e solvente extrator.



Fonte: Próprio autor.

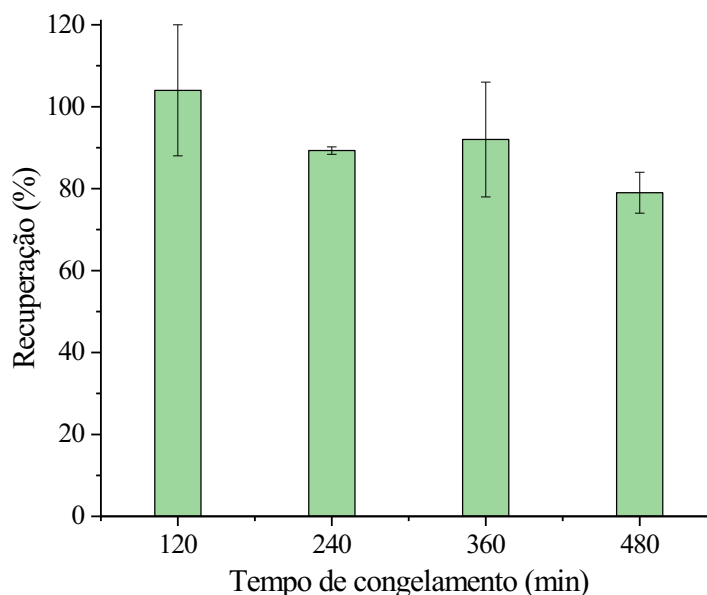
É possível notar, pela Figura 8, que a proporção de 3 mL de água para 6 mL de acetonitrila demonstrou maior taxa de recuperação dos resíduos do inseticida nas folhas de feijão, cerca de 89,3 %. A extração utilizando 4 mL de solvente extrator também resultou em boas taxas de recuperação, cerca de 88,0 %. Já em relação ao maior volume de água e solvente empregados, a porcentagem de extração foi de 73,0 %. A ESL-PBT de agrotóxicos envolve a utilização de maiores volumes de solvente, uma vez que o aumento do volume do extrator proporciona uma melhor partição do analito para a fase extratora (GOULART, 2010). Estudos sobre a otimização da ESL-PBT em amostras de banana prata, bolo e brigadeiro mostraram que o aumento do volume do solvente para 4 mL proporcionou maiores percentuais de recuperação dos agrotóxicos (CARDOSO, 2019; GOULART, 2010), o que se encontra compatível com os resultados deste trabalho. Entretanto, a eficiência da extração pode depender da matriz da amostra justamente pela sua influência na partição do analito para a fase orgânica, de forma que não há um volume padrão do solvente extrator a ser utilizado na ESL-PBT. Para a determinação de poluentes orgânicos em solos, por exemplo, o volume de 8 mL de acetonitrila na ESL-PBT foi empregado por apresentar maior taxa de recuperação (MESQUITA *et al.*, 2015). Para a extração de agrotóxicos de polpa de cajá-manga, os autores empregaram 6 mL de acetonitrila resultando nas melhores taxas de recuperação da ESL-PBT (SANTANA, 2017).

Os volumes de água e de solvente extrator escolhidos para a ESL-PBT de tiametoxam das folhas de feijoeiro foram definidos como 2,0 mL de água para 4,0 mL de acetonitrila, devido às justificativas acima, bem como econômicas e a menor geração de resíduos orgânicos ao meio ambiente.

4.2.4 Tempo de congelamento

A principal característica que diferencia a ESL-PBT de outros métodos de extração está no abaixamento da temperatura para a partição (extração) do analito da fase da amostra para a fase extratora. Assim, faz-se necessário o estudo do tempo necessário para a partição total do analito (tempo de congelamento) em função do tipo de amostra analisada (GOULART, 2010). Diante disso, amostras de 100 mg e na proporção 3:6 (v/v) água: ACN foram submetidas à 120, 240, 360 e 480 min de congelamento com o objetivo de obter a máxima partição do inseticida das folhas de feijoeiro. A Figura 9 apresenta as taxas de recuperação do tiametoxam nos tempos de congelamento da amostra avaliados.

Figura 9- Porcentagens de recuperação de tiametoxam das folhas de feijoeiro pela ESL-PBT em função de diferentes tempos de congelamento.



Fonte: Próprio autor.

Verifica-se, através da Figura 9, que ao aumentar o tempo de congelamento os resultados de recuperação não apresentam variações estatisticamente significativas entre si, apesar de se

observar um decréscimo em valores absolutos com o aumento do tempo de congelamento. É possível notar que os tempos de 240 e 360 min atuaram, de forma eficiente, na recuperação dos resíduos de tiametoxam com 89,3 e 92,0 %, respectivamente, entretanto, inferiores à porcentagem obtida pelo tempo de 120 min de congelamento. Para o tempo de 480 min a taxa de recuperação foi a mais baixa, 79,0 %, além de que houveram dificuldades quanto à quantificação já que o cromatograma apresentou picos com ombros. Acredita-se que a baixa extração pode ter ocorrido devido à adsorção do tiametoxam com a superfície sólida congelada da matriz das folhas de feijoeiro, com o tempo prolongado de contato da fase orgânica líquida contendo o tiametoxam. Assim, o melhor resultado foi obtido com um tempo de congelamento da amostra mais curto, resultando em 104,0 % de extração do inseticida. Este tempo de congelamento proporciona também uma diminuição no tempo total de preparação de amostra. Segundo o guia de validação e otimização SANTE/11312/2021 são permitidas taxas de recuperação de agrotóxicos na faixa de 70-120%, haja vista que os percentuais que excedem a 100% fazem referência ao efeito de matriz na extração (SANTE, 2022; PINHO *et al.*, 2010; CARDOSO 2019).

Estudos semelhantes que utilizaram a ESL-PBT para extração de agrotóxicos de amostras de alimentos e solo apresentaram tempos de congelamento mínimos de 3 h (GOULART, 2010; FERREIRA, 2019; SANTANA, 2017; COSTA *et al.*, 2014). Diante do exposto, o tempo de congelamento de 2 h, juntamente com a massa de 100 mg de folhas empregando os volumes de 2,0 mL de água e 4,0 mL de ACN foram as condições otimizadas para a ESL-PBT de tiametoxam das folhas de feijoeiro.

4.3 Validação do método de determinação de tiametoxam em folhas de feijoeiro

A validação de um método se refere a um processo contínuo e estratégico para a verificação das suas figuras de mérito (características) que comprovam a eficácia da metodologia para o propósito ao qual será aplicada (ANVISA, 2017). Nesse sentido, as figuras de mérito avaliadas neste trabalho foram seletividade, limite de quantificação, linearidade, faixa dinâmica linear, sensibilidade, efeito matriz, precisão, exatidão e robustez, seguindo o guia da Comunidade Europeia para controle de qualidade analítica e procedimentos de validação do método para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos e rações, documento SANTE/11312/2021 (SANTE, 2022).

4.3.1 Seletividade

A seletividade do método de extração do tiametoxam das folhas de feijão foi verificada a partir da comparação dos cromatogramas dos extratos da amostra fortificada com o tiametoxam e da amostra isenta do mesmo, conforme apresentado na Figura 3 (pág. 35). Foi possível observar que os componentes da matriz das folhas de feijão, coextraídos pela ESL-PBT, não apresentaram potencial risco de interferência na resposta analítica do tiametoxam, já que o pico referente ao analito é eluído de forma isolada no cromatograma. Dessa forma, a área compreendida sob o pico em 4,35 minutos de análise, tempo de retenção do tiametoxam, refere-se exclusivamente à eluição do analito. Conforme o guia SANTE/11312/2021, a seletividade do método é definida pela baixa interferência de outros compostos no pico do analito ou, de modo que a mesma seja inferior a 30% da área total do tiametoxam (SANTE, 2022). Portanto, é válido afirmar que o método selecionado é seletivo para a quantificação de tiametoxam nas folhas de feijoeiro.

4.3.2 Limite de quantificação

O limite de quantificação do método se refere à menor quantidade do analito que é possível de ser quantificada com precisão e exatidão, dentro dos critérios estabelecidos para essas duas figuras de mérito (ANVISA, 2017; SANTE, 2022). O LOQ foi determinado a partir da injeção consecutiva de soluções padrão de tiametoxam em concentrações decrescentes até o desaparecimento do pico do analito no cromatograma. Com isso, foram analisadas em duplicatas as soluções padrão de tiametoxam nas concentrações de 10,0; 7,5; 5,0; 2,5; 1,0; 0,5; 0,25; 0,10; 0,05; 0,01; 0,005 e 0,001 mg L⁻¹. Nos cromatogramas da solução padrão de tiametoxam a 0,001 mg L⁻¹ não foi possível diferenciar o sinal do ruído da linha de base no tempo de retenção do pico do analito. Com isso, o LOQ foi definido como sendo 0,005 mg L⁻¹, visto que as áreas obtidas para três injeções da solução padrão nesta concentração foram de 38, 36 e 37, sendo o desvio padrão relativo (RSD) igual a 2,7 %, o que implicou na detecção e boa repetibilidade para determinação da concentração do tiametoxam na amostra. O documento SANTE/11312/2021 define que o LOQ deve apresentar RSD < 20 % para as medidas realizadas em triplicata na menor concentração quantificável pelo método (SANTE, 2022).

O limite de detecção (LOD) está associado à menor concentração do analito que consegue ser detectada pelo método com precisão e exatidão (ANVISA, 2017; SANTE, 2022). O LOD pode ser determinado de diferentes maneiras, dentre as quais, a mais prática é aquela

em que se relaciona com o limite de quantificação. Desse modo, o LOD foi determinado diretamente pelo valor do LOQ, empregando a Equação 2 (WENZL *et al.*, 2016).

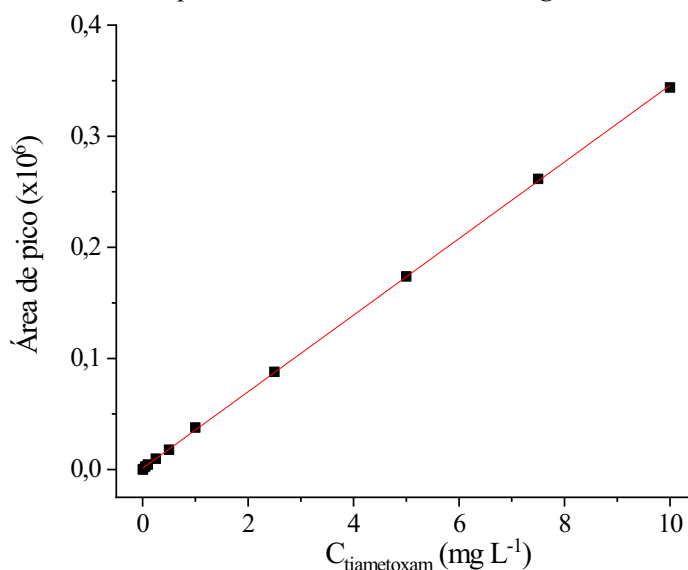
$$LOD = \frac{LOQ}{3,3} \quad \text{Equação 2}$$

No presente trabalho, o LOD obtido apresentou valor igual a $1,5 \times 10^{-3}$ mg L⁻¹, considerando a Equação 2. O LOQ deve apresentar valor abaixo do limite máximo de resíduos (LMR) definido para o analito na amostra em análise. Como não há LMR definido para o tiametoxam em folhas de feijoeiro, foi usado como referência o LMR para o tiametoxam no feijão com vagem, que é de 0,3 mg kg⁻¹ (FAO, 2019). Portanto, sendo o LOQ de 0,005 mg L⁻¹ no extrato e considerando as condições da ESL-PBT, o LOQ corresponde a 0,2 mg kg⁻¹ de tiametoxam nas folhas do feijoeiro, que é inferior ao LMR de tiametoxam em grãos de feijão. Logo, o método apresenta detectabilidade adequada para a quantificação de tiametoxam nas amostras de folhas de feijoeiro.

4.3.3 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer respostas lineares à concentração do analito na amostra (ANVISA, 2017). Em uma análise cromatográfica isso significa que a área do pico referente ao analito deve aumentar linearmente com a concentração do mesmo na amostra (SKOOG *et al.*, 2009). A linearidade do método de determinação do tiametoxam nas folhas de feijoeiro foi avaliada a partir da análise, em duplicata, de soluções padrão nas concentrações de 0,005 a 10,000 mg L⁻¹ de tiametoxam nas condições cromatográficas otimizadas. A menor concentração para este estudo foi definida como sendo o LOQ, menor concentração quantificável do tiametoxam. Assim, a Figura 10 apresenta o gráfico que relaciona as concentrações analisadas do tiametoxam em função da área do pico registrado no tempo de retenção para o composto.

Figura 10- Relação entre as concentrações de soluções padrão de tiametoxam em acetonitrila e a área do pico do inseticida nos cromatogramas.



Fonte: Próprio autor.

A Tabela 2 apresenta os parâmetros analíticos extraídos da relação entre a concentração e a resposta analítica do método para o tiametoxam.

Tabela 2- Parâmetros analíticos da relação entre a concentração do tiametoxam e a resposta analítica do método cromatográfico.

Parâmetros da equação da reta	
Coefficiente de correlação linear (r)	0,99994
Coefficiente de determinação (R^2)	0,99989
Coefficiente angular ($L \text{ mg}^{-1}$)	0,03447
Coefficiente linear	0,00111
Equação da reta	$A_{\text{pico}} = 0,00111 + 0,03447 \times C_{\text{tiametoxam}}$

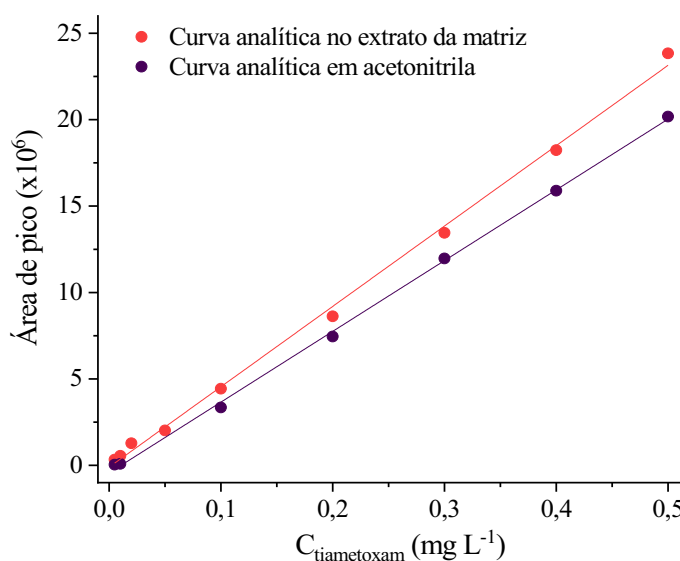
Fonte: Próprio autor.

Através da Figura 10 é possível notar a linearidade dos dados compreendidos entre as concentrações de 0,005 a 10,000 mg L^{-1} de tiametoxam. A validação da linearidade da relação foi obtida a partir da regressão linear dos dados, resultando em uma equação de reta. Os parâmetros avaliados para a confirmação da linearidade foram o coeficiente de correlação linear (r) e o coeficiente de determinação (R^2). De acordo com o guia de validação da Comunidade Europeia, um método é definido como linear quando $r > 0,99$ ou $R^2 > 0,98$ (SANTE, 2022). Com isso, considerando os coeficientes obtidos pela regressão linear, conforme apresentado na Tabela 2, o método de determinação de tiametoxam nas folhas de feijoeiro responde de forma linear à concentração do inseticida nas amostras.

4.3.4 Faixa dinâmica linear e sensibilidade

A faixa dinâmica linear ou faixa de trabalho é o intervalo de concentrações em que se espera encontrar o analito na amostra pesquisada (ANVISA, 2017). Para esse estudo, as soluções padrão do analito devem ser preparadas em solvente (padrão externo), quando a matriz da amostra não apresenta interferência no sinal do analito, ou no próprio extrato da matriz (adição padrão) caso a amostra seja complexa e o efeito matriz pronunciado na resposta cromatográfica (HARRIS, 2005). No presente trabalho, a faixa dinâmica linear foi estabelecida no intervalo das concentrações do tiametoxam entre o limite de quantificação e $100\times\text{LOQ}$. Assim, foram analisadas soluções padrão de tiametoxam preparadas em acetonitrila e no extrato nas concentrações de 0,005 a 0,500 mg L^{-1} . A Figura 11 apresenta as curvas analíticas obtidas nas condições cromatográficas otimizadas.

Figura 11- Curvas analíticas obtidas na faixa de trabalho do método a partir de soluções padrão de tiametoxam preparadas em acetonitrila e no extrato da matriz.



Fonte: Próprio autor.

A Tabela 3 apresenta os parâmetros extraídos das curvas analíticas apresentadas na Figura 11.

Tabela 3- Parâmetros relacionados às curvas analíticas para o tiametoxam obtidas pelo método do padrão externo e da calibração no extrato.

Parâmetros analíticos	Curva analítica em solvente	Curva analítica no extrato
Coef. de correlação linear (r)	0,99959	0,99884
Coef. de determinação (R ²)	0,99918	0,99769
Coef. angular (L mg ⁻¹)	40,948	46,504
Coef. linear	-0,438	-0,105
Equação da reta	$A = -0,438 + 40,948 \times C_{\text{tiametoxam}}$	$A = -0,105 + 46,504 \times C_{\text{tiametoxam}}$
Faixa de trabalho (mg L ⁻¹)	0,005 a 0,500	0,005 a 0,500

Fonte: Próprio autor.

Analisando a Figura 11 e a Tabela 3 observa-se que o método apresenta boa linearidade na faixa de trabalho de 0,005 a 0,500 mg L⁻¹ de tiametoxam, uma vez que os coeficientes de determinação (R²) e de correlação linear (r) apresentam valores acima dos critérios de aceitação estabelecidos (SANTE, 2022). Com isso, as equações de reta das curvas analíticas apresentadas são válidas para a conversão das áreas de pico do tiametoxam em concentrações do inseticida extraído das amostras de folha de feijoeiro, dentro da faixa de trabalho dinâmica linear.

A sensibilidade do método de determinação do tiametoxam foi obtida pelos valores dos coeficientes angulares das duas curvas analíticas, registrando-se 40,948 e 46,504 L mg⁻¹ para a curva analítica no solvente e no extrato, respectivamente. Observa-se, portanto, que a sensibilidade do método aumenta com o emprego da curva analítica preparada no extrato da matriz em relação àquela preparada em solvente. Este fato pode estar associado à presença de efeito matriz no processo de extração. Comparativamente a outros trabalhos na literatura, a ESL-PBT de tiametoxam, nas condições otimizadas, apresentou maior sensibilidade para amostras de folhas de feijão do que em amostras de maçã (PUSSENTE, 2008). Portanto, o método da ESL-PBT de tiametoxam de folhas de feijoeiro responde de forma linear ao teor de tiametoxam na faixa de 0,005 e 0,500 mg L⁻¹ de tiametoxam e sensibilidade, no mínimo, comparável a outros métodos ESL-PBT para extrações de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

4.3.5 Efeito matriz

O efeito matriz é o resultado da interferência dos componentes da matriz da amostra na resposta analítica do analito (ANVISA, 2017; SANTE, 2022). O efeito matriz do método de determinação de tiametoxam nas amostras de folhas de feijão foi avaliado, qualitativamente, a partir da comparação das curvas analíticas obtidas para as soluções padrão preparadas em

solvente e no extrato da matriz, Figura 11. Nota-se que as inclinações das duas curvas analíticas se diferem ligeiramente, portanto, não são exatamente paralelas, o que indica um pequeno efeito de componentes da matriz das folhas de feijoeiro na resposta do tiametoxam (ANVISA, 2017; SANTE, 2022). O efeito matriz foi determinado quantitativamente empregando a Equação 1 (PRESTES, 2007; SANTE, 2022). A porcentagem do efeito matriz (%EM) obtida foi de +13,6 % e, isso implica que compostos da matriz de folhas, mesmo não coelindo no tempo de retenção do tiametoxam, afetam positivamente a resposta do método para o analito. Segundo o documento SANTE/11312/2021, %EM abaixo de 20 % são pouco significativas, podendo considerar o método sem efeito matriz. No entanto, experimentalmente foi verificada a presença de um extrato colorido, devido à extração de pigmentos das folhas vegetais da matriz, tornando necessária a limpeza periódica da coluna utilizada com fases móveis com maiores forças de eluição para evitar o aumento do efeito matriz. Os resultados para o efeito matriz corroboram com os obtidos para a sensibilidade, em que foi observada maior sensibilidade para o método quando se utiliza a curva preparada no extrato da matriz. Com isso, a determinação das concentrações do tiametoxam nas amostras foram obtidas a partir da equação da reta da curva analítica preparada no extrato da matriz.

4.3.6 Ensaios para avaliação da exatidão e precisão do método

A exatidão de um método remete à concordância dos resultados com o valor de referência ou verdadeiro, evidenciado através de um valor padrão, da comparação entre métodos, da adição padrão ou por ensaios de adição e recuperação (ANVISA, 2017; RIBANI, *et al.* 2004). A precisão se define como a proximidade dos resultados experimentais entre si quando obtidos perante ensaios realizados sob as mesmas condições, ou seja, mesmo procedimento experimental, analista, equipamentos/ condições cromatográficas, laboratório e menor espaço de tempo entre cada uma das repetições (INMETRO, 2007; SANTE, 2022), este fator diz respeito à repetibilidade do método. Todavia, a precisão também pode ser avaliada a partir da concordância dos resultados obtidos com a mesma amostra submetida ao mesmo procedimento e laboratório, porém sob diferentes variáveis, como dias de realização dos experimentos, analistas e equipamentos/condições cromatográficas, definida como precisão intermediária do método ou reprodutibilidade dentro do laboratório (ANVISA, 2017; INMETRO, 2007; SANTE 2022).

A exatidão e a precisão (repetibilidade e reprodutibilidade dentro do laboratório) do método de determinação de tiametoxam das folhas de feijão foram realizadas a partir de ensaios

de adição e recuperação em dois níveis de concentrações do tiametoxam, 5×LOQ e 10×LOQ em sextuplicata. A reprodutibilidade dentro do laboratório foi avaliada pela realização das extrações de tiametoxam de folhas de feijoeiro em quatro dias e por dois analistas diferentes (analistas A e B). A exatidão foi avaliada pelas porcentagens de recuperação em comparação às concentrações adicionadas de tiametoxam nas amostras antes da extração. A Tabela 4 apresenta os valores de porcentagens de recuperação (%R) e desvio padrão relativo (RSD) referentes aos diferentes dias de execução do método pelos diferentes analistas.

Tabela 4- Porcentagens de recuperação e desvios padrão relativos para o tiametoxam extraído pelo método de ESL-PBT de folhas de feijoeiro em dois níveis de fortificações.

C _{Tiametoxam} (mg L ⁻¹)	Analista A				Analista B			
	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4	
	R(%)	RSD(%)	R(%)	RSD(%)	R(%)	RSD(%)	R(%)	RSD(%)
0,025 (5×LOQ)	99,1		89,9		108,9		103,6	
	97,8		95,6		96,6		100,9	
	86,2	5,8	86,8	4,7	96,5	7,9	96,3	4,0
	102,2		88,9		100,4		105,8	
	93,6		96,7		108,8		106,4	
	98,1		87,3		117,3		-	
Média	96,2		90,9		104,7		102,6	
0,050 (10×LOQ)	84,9		99,7		83,8		82,9	
	74,3		96,6		87,6		78,0	
	78,0	9,0	87,9	6,3	83,9	10,5	78,1	2,6
	70,9		91,5		76,8		78,3	
	65,5		86,8		66,1		78,6	
	79,1		100,4		89,1		-	
Média	75,5		93,8		81,2		79,2	

Fonte: Próprio autor.

Observa-se, a partir da Tabela 4, bons percentuais de extração independentemente dos dias e analistas estudados. Em termos de exatidão, as taxas de recuperação do analito variou, em média, de 75 a 105 %, dentro da faixa de aceitação, 70 a 120 %, preconizada pelo guia de validação da Comunidade Europeia para resíduos de agrotóxicos em alimentos (SANTE, 2022). Com relação à repetibilidade do método de determinação de tiametoxam em folhas de feijoeiro, verifica-se que os valores de RSD oscilaram entre 2,6 e 10,5 %, considerando os diferentes dias de execução do método e os dois analistas. Estes valores estão abaixo de 20 %, máximo recomendado pelo documento SANTE/11312/2021, indicando que o método proposto

apresenta boa repetibilidade (intra-dias) dos resultados. Os resultados da reprodutibilidade dentro do laboratório (ou precisão intermediária), que se referem ao RSD para as medidas realizadas entre dias diferentes e por analistas diferentes são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5- Porcentagens de recuperação e desvios padrão relativos para o tiametoxam extraído pelo método de ESL-PBT de folhas de feijoeiro em dois níveis de fortificações em diferentes dias por analistas distintos.

C_{tiametoxam} (mg L⁻¹)	R (%)	RSD(%)
0,025 (5×LOQ)	98,4	8,0
0,050 (10×LOQ)	82,6	11,3

Fonte: Próprio autor.

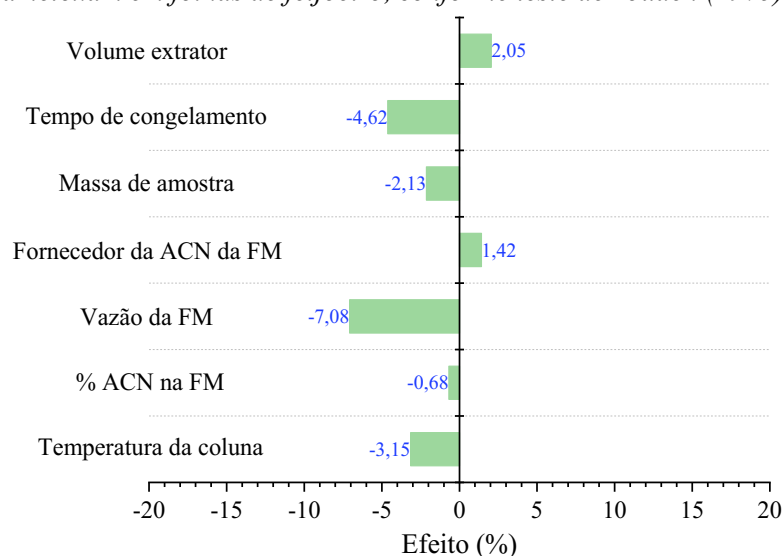
O desvio padrão relativo para as extrações de tiametoxam de folhas de feijoeiro realizadas inter-dias por dois analistas diferentes também se encontram abaixo dos 20 % preconizados pelos protocolos de validação (ANVISA, 2017; SANTE, 2022), confirmando que a execução do método ESL-PBT permanece precisa mesmo quando realizada por outro analista em outro momento. Portanto, considerando a discussão pautada, considera-se o método para a determinação de tiametoxam em folhas de feijão como preciso e exato, visto que os desvios padrão relativos são inferiores a 20 % e as porcentagens de recuperação estão compreendidas na faixa de 70 a 120 % (SANTE, 2022).

4.3.7 Robustez

A robustez de um método indica a capacidade do mesmo em apresentar respostas semelhantes frente à pequenas variações em suas condições (ANVISA, 2017; SANTE, 2022). Para o estudo da robustez do método de determinação de tiametoxam em folhas de feijão foi aplicado o teste de Youden, que se trata de um planejamento estatístico multivariado (YOU DEN; STEINER, 1975). De acordo com este teste, foram realizadas 8 extrações ESL-PBT de tiametoxam das folhas de feijoeiro, avaliando 7 fatores distintos em dois níveis cada (condição otimizada e condição modificada) simultaneamente por meio de um planejamento fatorial fracionário 2^{7-4} (SILVA *et al.*, 2023). Este teste visa simular pequenas alterações na metodologia de determinação do tiametoxam decorrentes da impossibilidade de reproduzi-la exatamente da forma que foi otimizada, seja pela ausência de uma marca específica de solvente, pelo uso de um equipamento diferente etc. Para tal, as variações provocadas no método otimizado foram realizadas de forma deliberada, ou seja, intencionalmente conforme o

planejamento descrito na Tabela 1. Os efeitos de cada uma das sete modificações provocadas na metodologia foram medidos a partir da diferença das taxas médias de recuperação de tiametoxam na condição otimizada (4 experimentos) e na condição modificada (4 experimentos). Os efeitos dos fatores avaliados na robustez do método de determinação de tiametoxam das folhas são apresentados na Figura 12.

Figura 12- Efeitos da modificação de algumas variáveis na metodologia de determinação de tiametoxam em folhas de feijoeiro, conforme teste de Youden (1975).



Fonte: Próprio autor.

É possível notar que as modificações realizadas no método diminuem ou aumentam as taxas de recuperação do tiametoxam das amostras de folhas de feijoeiro, porém a variação da resposta foi inferior a 7,1 %, mantendo as taxas de recuperação dentro da faixa recomendada de 70 a 120 % (SANTE, 2022). O maior efeito foi causado pela variação da vazão da fase móvel, resultando em deslocamento do pico do tiametoxam no cromatograma e, conseqüentemente, na sua quantificação. Assim, houve uma redução, em média, de 7,1 % da taxa de recuperação do tiametoxam com a diminuição da vazão da fase móvel em $0,2 \text{ mL min}^{-1}$. O segundo maior efeito no método foi provocado pelo aumento do tempo de congelamento durante a etapa de extração, resultando em uma redução de 4,6 %, em média, na taxa de recuperação do tiametoxam. O aumento da temperatura da coluna leva a uma redução do tempo de retenção do analito devido à diminuição da viscosidade dos solventes da FM, aumentando a taxa de transferência de massa do analito entre as fases móvel e estacionária. Essa alteração no método resultou na terceira maior variação da taxa de recuperação do tiametoxam no teste de robustez, uma redução de 3,2 %. Em síntese, a variação da vazão da fase móvel e do tempo de

congelamento são os fatores que levaram a maiores efeitos na porcentagem de extração do tiametoxam, embora os efeitos mantenham a recuperação do tiametoxam dentro da faixa de 70 a 120 %, indicando que a metodologia de determinação de tiametoxam nas folhas de feijoeiro pode ser considerada robusta.

5 CONCLUSÕES

A extração sólido-líquido com partição à baixa temperatura foi otimizada, no presente trabalho, para a extração de tiametoxam das folhas de feijoeiro e apresentou eficiência para o propósito desejado, uma vez que as recuperações dos resíduos do inseticida estiveram na faixa de 90 % a 100 %. Dentre os pontos positivos, o método adotado se define como um processo de fácil execução, simples, relativamente rápido e que requer pouca intervenção do analista. Embora haja a necessidade do uso de solventes orgânicos, o volume é inferior aos utilizados pelos métodos de extração sólido-líquido tradicionais, bem como emprega solventes menos tóxicos. Vale mencionar também que o fato de não empregar qualquer reagente ou solvente adicional, torna o processo economicamente viável e ambientalmente seguro proporcionando ao método vantagens requeridas para os métodos de extração modernos.

Além disso, através da validação do método, foi comprovada a confiabilidade do mesmo para determinações em níveis traços do tiametoxam de folhas de feijoeiro, haja vista o baixo limite de quantificação obtido ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$), mesmo empregando um sistema CLAE-DAD para quantificação. A resposta do método para a faixa de trabalho selecionada indicam que, independentemente do baixo efeito matriz observado, os sinais analíticos medidos para o pico do tiametoxam são diretamente lineares às concentrações do analito nas amostras de folhas de feijoeiro. O método apresentou boas seletividade, precisão e exatidão para a determinação do tiametoxam nas folhas do feijoeiro. A metodologia se mostrou robusta tanto para pequenas alterações realizadas na etapa de preparação da amostra quanto para aquelas realizadas na etapa de quantificação dos extratos. Por fim, todas as figuras de mérito atenderam as especificações do guia de validação selecionado de forma a demonstrar que, oficialmente, o método é eficiente para a determinação de tiametoxam nas folhas de feijoeiro. Assim, o método deverá ser empregado em trabalhos futuros para monitorar os resíduos de tiametoxam em folhas de feijoeiro submetidas a diferentes tratamentos com o inseticida em experimento realizado na Casa de Vegetação instalada na Universidade Federal de Uberlândia, *campus* Pontal.

REFERÊNCIAS

- ABD-ALRAHMAN, S.H. Residue and dissipation kinetics of thiamethoxam in a vegetable-field ecosystem using QuEChERS methodology combined with HPLC-DAD. *Food Chemistry*, v. 159, p. 1-4, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.124>
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Consulta Pública RDC nº 166, de 24 de Julho de 2017. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acesso em: 05 abr. 2023.
- ALMEIDA, A.S. **Tratamento de sementes de feijão com tiametoxam**. 2012. 139 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012. <http://guaiaca.ufpel.edu.br:8080/handle/123456789/1406>
- ÁVILA, C.J.; NAKANO, O. Efeito do regulador de crescimento lufenuron na reprodução de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 28, p. 293-299, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0301-80591999000200012>
- BARCELLOS, M. **Eletroforese capilar na determinação rápida de nitrato e nicotina em diferentes amostras**. 2012. 122f. Dissertação (Mestre em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012. <http://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/101017>
- BITTENCOURT, L.M. **Dissipação e monitoramento dos inseticidas clorpirifós e thiamethoxam em tubérculos e solo cultivado com batata (*Solanum tuberosum* L.)**. 2008. 81 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008. <https://locus.ufv.br/handle/123456789/2061>
- BOIÇA-JR, A.L.; MUÇOUÇA, M.J.; SANTOS, T.M.; BAUMGARTNER, J.G. Efeito de cultivares de feijoeiro, adubação e inseticidas sobre *Empoasca kraemeri* Ross e Moore, 1957 e *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889). *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 22, p. 955-961, 2000. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v22i0.2855>
- BONETT, L.P.; BAUMGARTNER, M.S.T.; KLEIN, A.C.; SILVA, L.I. Compostos nutricionais e fatores antinutricionais do feijão comum (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Arq. Ciênc. Saúde*, v. 11, p. 235-246, 2007. <https://ojs.revistasunipar.com.br/index.php/saude/article/view/2044>
- BORGES, C.T.; ALMEIDA, A.S.; DEUNER, C.; JAUER, A.; MENEGHELLO, G.E. Efeito do tiametoxam no tratamento de sementes de feijão. *Enciclopédia Biosfera*, v. 11, p. 898-907, 2015. <https://www.conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/1808>
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Política Agrícola. Portaria Nº 51/2021. Brasília, DF, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/plataformamaisbrasil/pt-br/comunicados-e-cronogramas/comunicados-gerais/2021/comunicado-no-51-2021-levantamento-anual-das-transferencias-da-uniao>
- CALDAS, S.S.; GONÇALVES, M.L.; PRIMEL, E.G.; PRESTES, O.D.; MARTINS, M.L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Química Nova*, v. 34, p. 1604-1617, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000900021>
- CARDOSO, A.T. **Extração sólido-líquido com partição à baixa temperatura para determinação de carbaril em banana prata (*Musa Sapientum*)**. 2019. 44f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, Itumbiara, 2019. <http://repositorio.ifg.edu.br:8080/handle/prefix/841>

- CARVALHO, L.S.M.J.; RODRIGUES, H.C.S.; MENEGHELLO, G.E.; ALMEIDA, A.S.; NAVROSKI, R. Desempenho fisiológico de sementes de feijão tratadas com produto bioativador. *Enciclopédia Biosfera*, v. 10, p. 1163-1172, 2014. <https://conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/2741>
- 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>
- COGO, C. Feijão: consumo e área em queda elevam tecnificação e produtividade da área no Brasil. Agosto, 2020. Disponível em: <https://www.carloscogo.com.br/>. Acesso em; 13 dez. 2021.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Editora Unicamp, p. 203-272, 2006.
- COSTA, A.I.G. **Análise Multirresíduos de agrotóxicos em alface por cromatografia gasosa**. 2011. 99f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011. <https://locus.ufv.br/handle/123456789/2099>
- COSTA, A.I.G.; QUEIROZ, M.E.L.R.; NEVES, A.A.; ASSIS, R.C.; SOARES, C.E.S.; SILVA, A.A.; ANTONINO, L.D.; OLIVEIRA, A.F.; BELLATO, C.R. Mobility and persistence of the herbicide fomesafen in soils cultivated with bean plants using SLE/LTP and HPLC/DAD. *Environ Sci Pollut Res*, v. 22, p. 3457-3466, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3557-5>
- COSTA, A.I.G.; QUEIROZ, M.E.L.R.; NEVES, A.A.; SOUSA, F.A.; ZAMBOLIM, L. Determination of pesticides in lettuce using solid-liquid extraction with low temperature partitioning. *Food Chemistry*, v. 181, p. 64-71, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.070>
- COSTA, L.G.; GIORDANO, G.; GUIZZETTI, M.; VITALONE, A. Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Frontiers in Bioscience*, v. 13, p. 1240-1249, 2008. <https://doi.org/10.2741/2758>
- CUMMIN, H.; RÜCKER, C. Octanol-Water Partition Coefficient Measurement by a Simple ¹H NMR Method. *ACS Omega*, v. 2, p. 6244–6249, 2017. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01102>
- DEL PINO, V.M.H.; LAJOLO, M.F. Efecto inhibitorio de los taninos del frijol carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre la digestibilidad de la faseolina por dos sistemas multienzimáticos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, p. 49-53, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612003000100011>
- DEMARI, G.H.; DE SOUZA, V.Q.; CARVALHO, I.R.; NARDINO, M.; FOLLMANN, D.N. Feijão em época não preferencial submetido a doses de nitrogênio e seu impacto nos caracteres agronômicos. *Enciclopédia Biosfera*, v. 11, p. 1102-1112, 2015. <https://www.conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/1833>
- ELIAS, R. Feijoada: breve história de uma instituição comestível. *Sabores do Brasil, Textos do Brasil*, n. 13, p. 33-39, 2004. <https://silo.tips/download/feijoada-breve-historia-de-uma-instituicao-comestivel>
- FARIA, L.C.; PELOSO, M.J.D; DA COSTA, J.G.C; RAVA, C.A.; CARNEIRO, G.E.S.; SOARES, D.M.; DÍAZ, J.L.C. Comunicado técnico, 45. BRS Radiante: nova cultivar precoce de feijoeiro comum com tipo de grão rajado. *Embrapa Arroz e Feijão*, p. 1-2, 2002. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAF/20443/1/comt_45.pdf. Acesso em: 16 nov. 2021.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Codex pesticides residues in food online database. 2019. Disponível em: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/en/>. Acesso em: 12 abr. 2023.

FERREIRA, C.M.; BARRIGOSI, J.A.F. Arroz e feijão: tradição e segurança alimentar. *Embrapa Arroz e Feijão*, p. 16-164, **2021**. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/225978/1/lv-2021.pdf>. Acesso em: 16 dez. 2021.

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

FREITAS, D.A. **Adsorção de tiametoxam em caldo de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) por carvão ativado nanomodificado e determinação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)**. 2019. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2019. <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/12006>

FUSCALDI, K.C.; PRADO, G.R. Análise econômica da cultura do feijão. *Revista de Política Agrícola*, v. 14, p. 17-30, **2005**. <https://seer.sede.embrapa.br/index.php/RPA/article/view/527/477>

GOULART, S.M. **Avaliação da técnica de extração com partição à baixa temperatura na análise de carbamatos em alimentos e bebidas**. 2010. 136f. Tese (Doutorado) em Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010. <http://www.sbicafe.ufv.br:80/handle/123456789/8353>

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC, p. 876, **2005**.

INMETRO, Instituto nacional de metrologia, normalização e qualidade industrial. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. **2007**. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_05.pdf

IUPAC. Global availability of information on agrochemicals. Thiamethoxam, **2015**. Disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/631.htm>. Acesso em: 8 dez. 2021.

LABINAS, A.M. **Controle de pragas na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e avaliação econômica**. 2002. 141f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002. <http://hdl.handle.net/11449/105450>

MANSUR, B.L. **Estudo comparativo de métodos de extração multirresíduo de agrotóxicos em maçã e tomate**. 2013. 70f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013. <https://locus.ufv.br/handle/123456789/2165>

MASTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S.J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticides residues. *Journal of Chromatographic A*, 1040: 259-272, **2004**. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.04.017>

MATTOS, L.L.; MARTINS, I.S. Consumo de fibras alimentares em população adulta. *Revista de Saúde Pública*, v. 34, p. 50-55, **2000**. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102000000100010>

MATTOS, M.L.T.; MARTINS, J.F.S.; CROCHEMORE, A.G.; GALARZ, L.A.; SCHULTZ, T.P. Dissipação do inseticida tiametoxam em água, sedimento e solo de lavoura de arroz irrigado. *Embrapa Clima Temperado*, p. 1-4, **2015**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1024339/dissipacao-do-inseticida-tiametoxam-em-agua-sedimento-e-solo-de-lavoura-de-arroz-irrigado>. Acesso em: 9 dez. 2021.

MESQUITA, R.S. **Avaliação da atividade inseticida de novos derivados de neonicotinóides em *Anopheles darlingi* ROOT, 1926 (DIPTERA: CULICIDAE)**. 2012. 115f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2012. <http://repositorioinstitucional.uea.edu.br/handle/riuea/2405>

MESQUITA, T.C.R.; SANTOS, R.R.; SÁ, L.J.; PINHO, G.P.; SILVÉRIO, F.O. Extração de poluentes orgânicos persistentes em solos agrícolas. CONBEA, 2015. Disponível em: <https://conbea.org.br/anais/publicacoes/conbea-2015/livros-2015/>

MOHAMED, F.; GAWARAMMANA, I.; ROBERTSON, T.A.; ROBERTS, M.S.; PALANGASINGHE, C.; ZAWAHIR, S.; JAYAMANNE, S.; KANDASAMY, J.; EDDLESTON, M.; BUCKLEY, N.A.; DAWSON, A.H.; ROBERTS, D.M. Acute human self-poisoning with imidacloprid compound: A neonicotinoid insecticide. *Plos one*, v. 4, p. 1-5, 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005127>

MORAIS, E.H.C.; RODRIGUES, A.A.Z.; QUEIROZ, M.E.L.R.; NEVES, A.A.; MORAIS, P.H.D. Determination of thiamethoxam, triadimenol and deltamethrin in pineapple using SLE-LTP extraction and gas chromatography. *Food Control*, v. 42, p. 9-17, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.024>

MOREIRA, M.F.; MANSUR, J.F.; MANSUR, J.F. Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos. *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*, p. 1-23, 2012. Disponível em: http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/images/documentos/biblioteca/Capitulo_15_Resistencia_a_Inseticidas_-_Estrategias_Desafios_e_Perspectivas_no_Controle_de_Insetos.pdf

OBANA, H.; OKIHASHI, M.; AKUTSU, K.; KITAGAWA, Y.; HORI, S. Determination of neonicotinoid pesticide residues in vegetables and fruits with solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 2501–2505, 2003. <https://doi.org/10.1021/jf0261102>

OLIVEIRA, V.S. **Sorção do inseticida tiametoxam em solos sob efeito de fosfato e vinhaça**. 2007. 48f. Dissertação (Mestre em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007. <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/3478>

OTAVIANO, C.M. **Desenvolvimento e otimização de método para extração do inseticida fipronil em cascas de ovos**. 2022. 46f. Monografia de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba, 2022. <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/34697>

PEREIRA, R.A. **Inibidores proteicos e seu potencial uso no controle de insetos-praga de importância para a cultura do café e do feijão**. 2005. 148f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2005. <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/12296>

PINHO, G.P. **Extração de pesticidas em amostras de tomate pelas técnicas: extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) e dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) para análise por cromatografia gasosa**. 2007. 98f. Dissertação (*Magister Scientiae* em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007. <https://locus.ufv.br/handle/123456789/2170>

PINHO, G.P.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, M.E.L.R.; SILVÉRIO, F.O. Pesticide determination in tomatoes by solid-liquid extraction with purification at low temperature and gas chromatography. *Food Chemistry*, v. 121, n. 1, p. 251-256, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.080>

PRESTES, O.D. **Desenvolvimento e validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em arroz polido utilizando método QuEChERS modificado, clean-up dispersivo e GC-MS (NCI-SIM)**. 2007. 117f. Dissertação (Mestre em química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria- RS, 2007. <http://repositorio.ufsm.br/handle/1/10641>

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>

PUBCHEM, disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5821911>. Acesso em: 17 mai. 2023.

PUSSENTE, I.G. **Extração sólido-líquido e partição a baixa temperatura (ESL-PBT) de clorpirifós, thiamethoxam e deltrametrina em maçã e análise por cromatografia gasosa**. 2008. 73f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008. <https://locus.ufv.br/handle/123456789/2074>

QUEIROZ, L.G.; SILVA, D.C.V.R. Inseticidas neonicotinoides: uma ameaça aos corpos hídricos brasileiros. IN: *Recurso água: tecnologias e pesquisa para o uso e a conservação de ecossistemas aquáticos*. São Carlos: Editora Cubo, p.11-34, **2021**. <https://doi.org/10.4322/978-65-86819-07-6-01>

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, **2004**. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>

RIGUEIRA, L.M.B.; RIBEIRO, K.L.; QUEIROZ, M.E.L.R.; NEVES, A.A.; ZAMBOLIM, L.; OLIVEIRA, R.M. Determination of chlorpyrifos and thiamethoxam in potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) and soil of Brazil using solid-liquid extraction with low temperature partitioning (SLE/LTP). *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 24, n. 12, p. 2042-2049, **2013**. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20130256>

RODRIGUES, A.A.Z.; QUEIROZ, M.E.L.R.; OLIVEIRA, A.F.; NEVES, A.A.; HELENO, F.F.; ZAMBOLIM, L.; FREITAS, J.F.; MORAIS, E.H.C. Pesticide residue removal in classic domestic processing of tomato and its effects on product quality. *J. Environ. Sci. Health*, v. 52, p. 850-857, **2017**. <https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1359049>

SANTANA, E.T.D. **Desenvolvimento e otimização de um método de determinação de resíduos de agrotóxicos em cajá-manga (*Spondias dulcis*), empregando ESL-PBT e CG-DIC**. 2017. 46f. Monografia de Conclusão (Graduação em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba, 2017.

SANTE, European Commission. 2022. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, SANTE 11312/2021, implemented by 01/01/2022. Disponível em: https://food.ec.europa.eu/system/files/2022-02/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2021-11312.pdf

SAMPAIO, M.R.F.; TOMASINI, D.; CARDOSO, L.V.; CALDAS, S.S.; PRIMEL, E.G. Determination of pesticide residues in sugarcane honey by QuEChERS and liquid chromatography. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 23, p.197-205, **2012**. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532012000200002>

SECCIA, S.; FIDENTE, P.; MONTESANO, D.; MORRICA, P. Determination of neonicotinoid insecticides residues in bovine milk samples by solid-phase extraction clean-up and liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1214, p. 115-120, **2008**. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.088>

SILVA, K.C.; CALDEIRA, G.R.F.; NOGUEIRA, K.G.; CANELA, M.C.; FILGUEIRAS, P.R.; SOUZA, M.D.O. Café com quimiometria: uma aplicação do planejamento fatorial fracionário 2⁵⁻¹. *Química Nova*, v. 46, p. 98-107, **2023**. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170943>

SILVA, O.F.; WANDER, A.E. O feijão-comum no Brasil: passado, presente e futuro. Documentos, 287: Embrapa Arroz e Feijão, ed. 1ª, p. 11-63, junho/2013. Disponível em: <https://www.embrapa.br/arroz-e-feijao>. Acesso em: 12 nov. 2021.

SILVA, R.A.G. **Desenvolvimento e validação de método para determinação de multirresíduos de agrotóxicos em mel por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas em série.** 2020. 134f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020. <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/28873>

SKOOG, A.D.; HOLLER, J.; CROUCH, S. **Princípios de Análise Instrumental.** São Paulo: Bookman, 6ª ed., p. 830-832, 2009.

SKOOG, A.D.; WEST, D.; HOLLER, J.; CROUCH, S. **Fundamentos de Química Analítica.** 8ª ed. São Paulo: Cengage Learning, p. 862-868, 2008.

SOARES, C.E.S. **Extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura e seu emprego na análise multirresíduos de agrotóxicos em uva e derivados.** 2011. 88f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011. <https://locus.ufv.br/handle/123456789/2101>

SPARKS, T.C.; NAUEN, R. IRAC: mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 121, p. 122-128, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.11.014>

VIEIRA, H.P. **Otimização e validação de extração simultânea de piretróides em água e solo e análise por cromatografia gasosa.** 2005. 65f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005. <https://locus.ufv.br/handle/123456789/8782>

VIEIRA, H.P.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, M.E.L.R. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. *Química Nova*, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000300006>

WENZL, T.; SCHAECHTELE, A.; HAEDRICH, J.; ROBOUCH, P.; STROKA, J. Guidance document on the estimation of LOD and LOQ for measurements in the field of contaminants in feed and food. *European Union Reference Laboratory*. 2016. Disponível em: https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_lod_en.pdf. Acesso em: 17 mai. 2023.

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

ZHANG, Q.; LIN, L; YE, W. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*, v. 13, 20, 26p, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>