



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Rua Vinte, 1600. Bairro Tupã, CEP 38304-402. Ituiutaba/MG



IGOR MELO DE LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS
EM TECIDOS ADIPOSE E HEPÁTICO DE ANUROS EMPREGANDO EXTRAÇÃO
QuEChERS MINIATURIZADA**

ITUIUTABA/MG

2020

IGOR DE MELO LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS
EM TECIDOS ADIPOSE E HEPÁTICO DE ANUROS EMPREGANDO EXTRAÇÃO
QuEChERS MINIATURIZADA**

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

Orientador: Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria

ITUIUTABA/MG

2020

IGOR DE MELO LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS
EM TECIDOS ADIPOSE E HEPÁTICO DE ANUROS EMPREGANDO EXTRAÇÃO
QuEChERS MINIATURIZADA**

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

Ituiutaba, 18 de dezembro de 2020

COMISSÃO AVALIADORA

MSc. Patrícia de Menezes Gondim / Doutoranda em Ecologia e Recursos Naturais, UFC

Profa. Dra. Regina Massako Takeuchi

Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria (Orientador)

DEDICATÓRIA

À minha família, pelo amor, carinho e apoio nos momentos mais difíceis. Em especial à minha querida vó, Maria do Socorro, por simplesmente fazer meus dias mais felizes. A minha linda mãe, Ana Paula, pela luta diária, sem medir esforços para me apoiar. E para você meu Tio, Rubens Pierre, que nos deixou esse ano para ficar na companhia de Deus. A vocês, com amor, expresso o meu maior agradecimento!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me guiar durante toda essa jornada universitária, me dando sabedoria, confiança e um caminho para chegar em meus objetivos. Minha eterna fé e gratidão.

Agradeço a minha linda família, porque sem vocês eu não chegaria a lugar algum. Agradeço a minha mãe e meu padrasto, Ana Paula e Moisés, que sempre me apoiaram. Minha vó, Maria do Socorro, pelos conselhos e todo amor concedido. A minhas tias, Rita de Cássia e Vela, por todo amor e carinho. Meus irmãos, José Paulo e Júnior, por toda força e carinho.

Em especial, quero deixar meu agradecimento ao meu Tio, Rubens Pierre, que foi ficar na companhia de Deus e olhar por toda nossa família lá de cima. A você, meu querido tio, deixo meu agradecimento por todos os conselhos ditos, que nunca serão esquecidos. Deixo também meu eterno amor e minha eterna saudade.

Agradeço ao Prof. Dr. Anizio, pelos ensinamentos e paciência durante toda essa jornada, sempre com muito respeito. Obrigado por toda ajuda e conselhos, graças a você busco todos os dias melhorar e me dedicar cada vez mais. Ao Allyson Leandro, por todas as broncas e conselhos que me ajudaram muito durante toda a pesquisa. A Giselle e Andressa por toda ajuda no desenvolvimento da pesquisa. A todos do grupo de Pesquisa em Cromatografia, CroMat, pelas conversas durante todo meu tempo no laboratório e nas reuniões de grupo. A todo corpo docente da UFU-Pontal, pelo conhecimento fornecido, não só para me tornar um químico, mas um cidadão melhor.

Queria deixar meu agradecimento em especial para Thaís Souza, pelo apoio durante toda minha graduação. Aos meus amigos que estiveram comigo desde o início, Lucas Silva e Murilo Falco. Agradeço ao Marcos, Mateus e a todos do laboratório de pesquisa, CT-INFRA III, pelas conversas, conselhos e apoio durante todo a pesquisa.

À FINEP, Financiadora de Estudos e Projetos, por apoiar a construção do prédio do CT-INFRA III em que estão localizados os laboratórios de pesquisa onde foram desenvolvidas todas as etapas deste trabalho.

A vocês, deixo minha eterna gratidão e meu agradecimento.

EPÍGRAFE

“Aquilo que nós mesmo escolhemos é muito pouco: a vida e as circunstâncias fazem quase tudo”

J. R. R. Tolkien

RESUMO

A utilização de agrotóxicos em várias culturas com intuito de combater pragas e doenças sempre foi um fator que exigiu prudência e monitoramento, porém seu uso vem se intensificando ao longo das últimas décadas. Apesar de algumas vantagens imediatas no controle de pragas, a sua utilização em larga escala vem causando grandes transtornos e modificações no meio ambiente, como contaminação do solo e da água e risco de contaminação de espécies não-alvo. A contaminação indireta de muitas espécies de animais como os anuros, por exemplo, pode levar a uma diminuição do crescimento, aumento de anormalidades e, em alguns casos levar a morte. Entretanto, para avaliar a presença destes compostos nos anuros é necessária uma etapa invasiva de retirada de parte do tecido do animal. Desta forma, neste trabalho foram desenvolvidos dois métodos de determinação de multirresíduos de agrotóxicos em tecidos que mimetizam os de anuros (tecido adiposo e hepático de frango), para posteriormente aplicá-los nas análises de tecidos de anuros. Os agrotóxicos selecionados para o estudo foram o clorpirifós, cipermetrina, endossulfan e atrazina. O método de extração selecionado foi o método QuEChERS aliado à cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de fotodiodos, como técnica de separação e quantificação dos agrotóxicos. Os métodos QuEChERS foram miniaturizados de forma a reduzir significativamente as quantidades de amostras, solventes, sais e sorventes de limpeza visando a obtenção de métodos mais econômicos e alta eficiência na recuperação. Neste sentido, alguns parâmetros foram otimizados, como solvente extrator, quantidade de sais para promover o efeito salting out e sorventes de limpeza. O solvente que apresentou melhores percentuais de recuperação foi a acetonitrila, para ambas as matrizes. A etapa de limpeza não foi relevante para as amostras de tecido adiposo, mas foi imprescindível para as amostras de tecido hepático. Após a otimização do método de extração para ambas as matrizes, o método foi validado seguindo o guia de validação da comunidade Europeia, documento SANTE/12682/2019. Assim, o método proposto foi capaz de extrair, separar e quantificar agrotóxicos em amostras complexas como os tecidos adiposo e hepático de frangos com LOQ da ordem de 0,01-0,07 mg L⁻¹, indicando que o método apresenta boa detectabilidade, podendo avaliar a presença de resíduos de agrotóxicos em baixas concentrações nos tecidos dos anuros.

Palavras-chave: QuEChERS, agrotóxicos, validação de métodos, anuros, tecido adiposo, tecido hepático.

ABSTRACT

The use of pesticides in various cultures to combat plagues and diseases has always been a factor that required prudence and monitoring, but its use has been intensifying over the last few decades. Despite some immediate advantages in pest control, its use on a large scale has caused major disturbances and changes in the environment, such as soil and water contamination and risk of contamination of non-target species. Indirect contamination of many animal species such as frogs can lead to decreased growth, increased abnormalities, and, in some cases, lead to death. However, to assess the presence of these compounds in anurans, an invasive step of removing part of the animal's tissue is necessary. Thus, in this work, two methods for the determination of pesticide multiresidues in tissues, that mimic those of anurans (adipose and hepatic chicken tissue), were developed for the analysis of pesticide contamination of anuran tissues. The pesticides selected for the study were chlorpyrifos, cypermethrin, endosulfan, and atrazine. The selected extraction method was the QuEChERS combined with high-performance liquid chromatography coupled to the photodiode array detector, as a technique for separating and quantifying the pesticide residues. The QuEChERS were miniaturized to significantly reduce the amounts of samples, solvents, salts, and cleaning sorbents obtaining more economical and high recovery efficiency methods. Some QuEChERS conditions were optimized, such as solvent extractor, mass of salts to promote the salting-out effect, and cleaning sorbents. The solvent that showed the best recovery percentages was acetonitrile, for both matrices. The cleaning step was not relevant for the adipose tissue samples, but it was essential for the liver tissue ones. After optimizing the extraction method for both matrices, the method was validated following the European Community validation guide, SANTE/12682/2019 document. Thus, the proposed method was able to extract, separate, and quantify pesticides in complex samples such as adipose and hepatic tissue from chickens with LOQ range from 0.01-0.07 mg L⁻¹, indicating that the method has good detectability, being able to evaluate the presence of pesticide residues in low concentrations in the anuran tissues.

Keywords: QuEChERS, pesticides, method validation, anurans, adipose tissue, liver tissue.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
C18	octadecilsilano
DAD	<i>Diode array detector</i> – Detector de arranjo de diodos
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> – Cromatografia líquida de alta eficiência
LOD	<i>Limit of detection</i> – limite de detecção
LOQ	<i>Limit of quantification</i> – limite de quantificação
MeOH	Metanol
MF	Mistura de fortificação
PSA	<i>Primary secondary amine</i> – Amina primária secundária
QuEChERS	<i>Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe</i> – Rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro.
RSD	<i>relative standard deviation</i> – Desvio padrão relativo
Si(PDMS)	Poli(dimetilsiloxano) imobilizado termicamente sobre sílica
Si(PGPMS)	Poli(glicidoxipropilmetil- <i>co</i> -dimetilsiloxano) imobilizado termicamente sobre sílica
Si(PDAS)	Poli(dimetilsiloxano- <i>co</i> -alquilmetilsiloxano) imobilizado termicamente sobre sílica

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos agrotóxicos referente a sua toxicidade à saúde humana. _____	16
Tabela 2. Propriedades e estruturas químicas dos agrotóxicos estudados neste trabalho. _____	21
Tabela 3. Concentração dos agrotóxicos na mistura de fortificação para o estudo de otimização do método QuEChERS. _____	30
Tabela 4. Solventes e sorventes avaliados na otimização do método QuEChERS para extração de resíduos de agrotóxicos do tecido adiposo. _____	31
Tabela 5. Variações realizadas nos experimentos visando a condição ideal do método de extração de resíduos de agrotóxicos de amostras de tecido hepático. _____	33
Tabela 6. Matriz do planejamento de experimentos para a avaliação da robustez dos métodos analíticos propostos, empregando o teste de Youden. _____	39
Tabela 7. Dados referentes às curvas analíticas obtidas pelos métodos do padrão externo (■), da calibração na matriz (●) e da adição padrão (▲) para as amostras de tecido adiposo. ____	53
Tabela 8. Dados referentes às curvas analíticas obtidas pelos métodos do padrão externo (■), da calibração na matriz (●) e da adição padrão (▲) para as amostras de tecido hepático. ____	56
Tabela 9. Figuras de mérito obtidas para os métodos de determinação de agrotóxicos em amostras de tecido (A) adiposo e (B) hepático. _____	59
Tabela 10. Precisão, no nível de repetibilidade, do método de determinação de agrotóxicos em tecido adiposo baseado na extração mini-QuEChERS. (n = 6) _____	60
Tabela 11. Precisão, no nível de repetibilidade, do método de determinação de agrotóxicos em tecido hepático baseado na extração mini-QuEChERS. (n = 6) _____	61
Tabela 12. Precisão, no nível de precisão intermediária, do método de determinação de agrotóxicos em tecido adiposo baseado na extração mini-QuEChERS. (n = 18) _____	62
Tabela 13. Precisão, no nível de precisão intermediária, do método de determinação de agrotóxicos em tecido hepático baseado na extração mini-QuEChERS. (n = 18) _____	63
Tabela 14. Porcentagens de recuperação obtidas em dois níveis de concentração e em três dias distintos para avaliar a exatidão do método de determinação de agrotóxicos em tecido adiposo. _____	64
Tabela 15. Porcentagens de recuperação obtidas em dois níveis de concentração e em três dias distintos para avaliar a exatidão do método de determinação de agrotóxicos em tecido hepático. _____	65

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Espécies de anuros registrados na região do Médio Rio Jaguaribe, Ceará. A) <i>Rhinella granulosa</i> (AAGARDA 10216); B) <i>Rhinella jimi</i> (AAGARDA 10292); C) <i>Corythomantis greening</i> (AAGARDA 10391); D) <i>Dendropsophus nanus</i> (AAGARDA 10276); E) <i>Hypsiboas raniceps</i> (AAGARDA 10404); F) <i>Phyllomedusa nordestina</i> (indivíduo não coletado).	18
Figura 2. Cidade de Tabuleiro do Norte, Ceará. Curso do Rio Jaguaribe.	20
Figura 3. Fluxograma das etapas envolvidas no método QuEChERS original proposto por Anastassiades <i>et al.</i> (2003).	23
Figura 4. Fluxograma geral do método QuEChERS submetido ao estudo de otimização para a extração dos resíduos de agrotóxicos de tecido adiposo.	31
Figura 5. Esquema com todas as etapas envolvidos no processo de extração otimizado para gordura sem etapa de limpeza.	32
Figura 6. Fluxograma geral dos 6 experimentos realizados na otimização do método para a matriz do fígado do frango caipira.	33
Figura 7. Ilustração do processo de extração de resíduos de agrotóxicos de amostras de tecido hepático, utilizando o método QuEChERS.	34
Figura 8. Cromatograma da separação da mistura dos agrotóxicos. Fase móvel MeOH:H ₂ O (80:20, v/v), vazão de 1,0 mL min ⁻¹ ; detecção DAD em 220 nm; coluna cromatográfica: X-Select C18 HSS. Identificação dos picos: (1) Atrazina; (2) α -endossulfan; (3) clorpirifós; (4) β -endossulfan; (5) α -cipermetrina; (6) β -cipermetrina; (7) θ -cipermetrina; (8) ζ -cipermetrina.	42
Figura 9. Avaliação do melhor solvente extrator para o método mini-QuEChERS na extração dos agrotóxicos de tecido adiposo.	43
Figura 10. Avaliação de diferentes sorventes de limpeza para a extração de agrotóxicos de tecido adiposo, empregando o método mini-QuEChERS.	44
Figura 11. Avaliação da recuperação dos agrotóxicos de amostras de tecido adiposo, com e sem etapa de limpeza, após a inclusão de uma etapa de adição de água.	46
Figura 12. Método Mini-QuEChERS otimizado para extração de agrotóxicos de amostras de tecido adiposo.	47
Figura 13. Avaliação das taxas de recuperação de agrotóxicos de tecido hepático na otimização do método mini-QuEChERS avaliando diferentes solventes extratores e sorventes de limpeza.	48

- Figura 14.** Fluxograma do método Mini-QuEChERS otimizado para extração dos resíduos de agrotóxicos de tecido hepático. _____ 49
- Figura 15.** Cromatogramas do branco da amostra de (a) tecido adiposo e de (b) tecido hepático comparados com cromatograma de uma solução padrão da mistura de agrotóxicos. FM MeOH:H₂O (80:20, v/v), vazão 1,0 mL min⁻¹; detecção 220 nm; coluna X-Select C₁₈ HSS. Identificação dos picos: (1) atrazina; (2) α -endossulfan; (3) clorpirifós; (4) β -endossulfan; (5) α -cipermetrina; (6) β -cipermetrina; (7) θ -cipermetrina; (8) ζ -cipermetrina _____ 50
- Figura 16.** Curvas analíticas dos agrotóxicos em estudo obtidas para o tecido adiposo sob diferentes métodos de calibração. Agrotóxicos: (A) α -endossulfan; (B) Clorpirifós; (C) β -endossulfan; (D) α -cipermetrina; (E) β -cipermetrina; (F) ζ -cipermetrina; (G) θ -cipermetrina; (H) atrazina; (I) α , β , θ -cipermetrina. _____ 52
- Figura 17.** Curvas analíticas dos agrotóxicos em estudo obtidas para o tecido hepático sob diferentes métodos de calibração. Agrotóxicos: (a) β -endossulfan; (b) α -cipermetrina; (c) ζ -cipermetrina; (d) β -cipermetrina; (e) θ -cipermetrina; (f) atrazina; (g) clorpirifós; (h) α , β , θ -cipermetrina. _____ 55
- Figura 18.** Porcentagens do efeito matriz obtidas para cada agrotóxico empregando o método mini-QuEChERS para as amostras de tecidos (a) adiposo e (b) hepático. _____ 58
- Figura 19.** Efeito dos fatores avaliados no estudo de robustez dos métodos de determinação de agrotóxicos em (a) tecido adiposo e (b) tecido hepático, empregando os respectivos métodos mini-QuEChERS propostos. _____ 66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Agrotóxicos	14
1.2 Anuros	17
1.3 Métodos de extração	21
1.4 Validação de métodos analíticos	25
2 OBJETIVOS	28
3 EXPERIMENTAL	29
3.1 Preparação das soluções padrão dos agrotóxicos	29
3.2 Preparação das soluções padrão dos agrotóxicos	29
3.3 Otimização do método de extração QuEChERS	29
3.3.1 Amostras de tecido adiposo	30
3.3.2 Amostras de tecido hepático	32
3.4 Análises cromatográficas dos extratos por HPLC-DAD	34
3.5 Preparação das curvas analíticas	35
3.5.1 Método do padrão externo	35
3.5.2 Método da adição padrão	35
3.5.3 Método da calibração na matriz	36
3.6 Validação dos métodos desenvolvidos	36
3.6.1 Seletividade	37
3.6.2 Linearidade e faixa de trabalho	37
3.6.3 Efeito matriz	37
3.6.4 Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ)	38
3.6.5 Exatidão e precisão	38
3.6.6 Robustez	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Otimização das condições cromatográficas de análise dos agrotóxicos	41
4.2 Otimização dos métodos de extração QuEChERS	42
4.2.1 Amostras de tecido adiposo	42
4.2.2 Amostras de tecido hepático	47
4.3 Validação dos métodos analíticos	49

4.3.1 Seletividade	50
4.3.2 Linearidade e faixa de trabalho	51
4.3.3 Efeito matriz	57
4.3.4 Limites de quantificação e de detecção	59
4.3.5 Precisão dos métodos	60
4.3.5.1 Repetibilidade	60
4.3.5.2 Precisão intermediária ou reprodutibilidade dentro do laboratório	61
4.3.6 Exatidão (ensaios de recuperação)	63
4.3.7 Robustez (teste de Youden)	65
5 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

O elevado crescimento da população mundial observado nas últimas décadas, acompanhado do desenvolvimento tecnológico, tem trazido desvantagens aos ecossistemas. Com o crescimento urbano, o consumo e a demanda por produtos alimentícios vêm exigindo a utilização cada vez maior de produtos químicos em áreas de cultivo agrícola. Dentre estes produtos destacam-se os agrotóxicos.

1.1 Agrotóxicos

Considerada uma revolução na civilização humana, o início da agricultura foi fundamental para evolução dos seres humanos, já que eles passaram a produzir seus alimentos através da domesticação de animais e de plantas nos locais onde viviam (BOARETTO, 2009). Com a expansão da agricultura, há cerca de 10.000 mil anos, a densidade populacional aumentou, o homem começou a armazenar grãos, vegetais e carnes tornando-os fonte de alimentos para seus grandes agrupamentos. Por volta do ano de 1798, a população alcançou incríveis 1 bilhão de habitantes. Neste momento, a preocupação com a produção de alimentos começou a se tornar cada vez mais iminente, pois a população aumentava consideravelmente, diferentemente da produção alimentícia (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012; BORSOI *et al.*, 2014).

Além disso, os campos onde são cultivados os alimentos, tornam-se fontes de nutrimentos para as mais variadas espécies, como: insetos, roedores, fungos e bactérias. Estas espécies se multiplicam rapidamente devido à grande quantidade de alimento disponível, levando a perdas nas colheitas, além de interferir no bem-estar das pessoas. Por estes fatores, estas espécies predadoras de alimentos foram chamadas de pragas. Devido à existência destas pragas nas lavouras, os produtores rurais sempre tiveram que competir com insetos, ácaros, nematoides, roedores, lesmas e caracóis, aves, patógenos vegetais (vírus, bactérias, fungos, chromista) e ervas daninhas (plantas competitivas) (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012; OERKE, 2006).

Com elevado crescimento da população mundial observado nas últimas décadas, o homem buscou maneiras para combater as pragas que atacavam suas plantações, para gerar alimentos suficientes e abastecer toda a população (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012). Estas pragas podem ser controladas através de medidas físicas (cultivo e mecânica), biológicas (escolha de cultivares, rotação de culturas, antagonistas e predadores) e químicas (agrotóxicos) (OERKE, 2006).

Os agrotóxicos são compostos que possuem uma grande variedade de substâncias químicas que foram desenvolvidos com intuito de potencializar uma ação biocida, ou seja, são

desenvolvidos para matar, exterminar e combater pragas agrícolas. Além disso, representam um risco em potencial para todos os organismos vivos, podendo ser absorvidos via dérmica, inspirados pelos pulmões ou ingeridos em produtos contaminados. Os efeitos adversos que os agrotóxicos causam à saúde dependem de suas características químicas, da quantidade absorvida ou ingerida, do tempo de exposição e das condições gerais de saúde da pessoa contaminada (VEIGA, 2007).

Com o uso generalizado dos agrotóxicos nas mais diferentes áreas e condições ambientais, grandes transtornos e modificações estão ocorrendo no meio ambiente, tanto pela contaminação de comunidades de seres vivos, como pela acumulação nos segmentos bióticos e abióticos do ecossistema. Um efeito indesejável provocado pela sua utilização é a contaminação de espécies não-alvo, ou seja, que não interferem no processo de produção. Além disso, a ocorrência de resíduos em alimentos, solos, ar atmosférico e água e a intoxicação de aplicadores, muitas vezes sem a devida proteção, são fatos recorrentes da contaminação por estes produtos (RIBAS; MATSUMURA, 2009; CAMPANHOLA; BETTIOL; RODRIGUES, 1998).

Os agrotóxicos apresentam propriedades distintas e, uma grande preocupação referente a sua utilização é o destino final de suas moléculas. Os processos envolvidos neste destino variam de acordo com as suas propriedades físico-químicas, forma de aplicação, características do solo e condições ambientais. Dentre estes, estão a lixiviação, escoamento superficial, sorção, degradação química, biológica e volatilização (REBELO; CALDAS, 2014).

A avaliação e a classificação do grau de periculosidade que um agrotóxico pode causar ao meio ambiente é baseado em estudos físico-químicos, toxicológicos e ecotoxicológicos. Portanto, um agrotóxico pode ser classificado de acordo com a sua periculosidade ambiental, em classes que variam de I à IV: onde a Classe I é altamente perigosa ao meio ambiente e a Classe IV pouco perigosa ao meio ambiente (IBAMA, 1996). Os agrotóxicos também podem ser classificados em função dos seus efeitos à saúde humana, decorrente da exposição a esses agentes. Essa classificação é realizada através de estudos feitos em laboratórios que estabelecem a dosagem letal do agrotóxico em 50 % dos animais utilizados naquela concentração (DL_{50}). Na Tabela 1 estão apresentadas essas respectivas classes e sua classificação em função dos efeitos à saúde decorrentes da exposição humana a estes agentes. (BRASIL, 1992; RIBAS; MATSUMURA, 2009).

Tabela 1. Classificação dos agrotóxicos referente a sua toxicidade à saúde humana.

Classe toxicológica	Toxicidade	Dosagem Letal (DL ₅₀)	Faixa colorida
I	Extremamente tóxico	≤ 5 mg/kg	Vermelha
II	Altamente tóxico	Entre 5 e 50 mg/kg	Amarela
III	Medianamente tóxico	Entre 50 e 500 mg/kg	Azul
IV	Muito pouco tóxico	Entre 500 e 5.000 mg/kg	Verde

Fonte: adaptado de (PERES *et al.*, 2003).

Os agrotóxicos também podem ser classificados de acordo com os organismos vivos que combatem. Portanto, podem ser inseticidas (controle de insetos), fungicidas (controle de fungos), acaricidas (controle de ácaros), herbicidas (controle de plantas invasoras), desfolhantes (controle de plantas indesejadas), fumigantes (controle de bactérias no solo), raticidas (controle de ratos) e nematicidas (controle de nematoides) (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003).

No Brasil, devido à extensão de terras agricultáveis e ao protagonismo na exportação de produtos agrícolas, o uso de agrotóxicos tem aumentado acima dos níveis de desenvolvimento do país, alcançando a partir de 2008 o incômodo primeiro lugar mundial no ranking de maiores consumidores de agrotóxicos. Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) divulgados em abril de 2012, enquanto o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93 %, o mercado brasileiro cresceu cerca de 190 % (CASSAL *et al.*, 2014).

No estado do Ceará, a bacia hidrográfica do Rio Jaguaribe ocupa uma área de 74.621 km², correspondendo a quase 48 % do território do estado. Ela é subdividida em cinco sub-bacias: Salgado, Alto Jaguaribe, Médio Jaguaribe, Baixo Jaguaribe e Banabuiú. Os municípios que compõem a região do Baixo Jaguaribe são: Alto Santo, Ibicuitinga, Itaiçaba, Jaguaretama, Jaguaribara, Jaguaruana, Limoeiro do Norte, Morada Nova, Palhano, Quixeré, Russas, São João do Jaguaribe, Tabuleiro do Norte (GONDIM *et al.*, 2004). De acordo com o Conselho de Desenvolvimento Regional do Baixo Jaguaribe, a fruticultura se destaca na região, devido à instalação de um agropolo e incentivo financeiro promovido pelo governo federal. Dentre os municípios, alguns se destacam pela grande produção agrícola e diversidade de culturas, como os cultivos de banana, arroz, limão, milho, mamão e sorgo (MILHOME *et al.*, 2009).

Na região do Baixo Jaguaribe, diversos tipos de agrotóxicos estão sendo empregados. Dos 37 agrotóxicos utilizados 46 % são inseticidas e 30 % acaricidas. Em relação a sua toxicidade, 54 % dos princípios ativos utilizados pertencem às classes I e II, ou seja, extremamente tóxicos (FREITAS; BOMBARDI, 2018). Outro fato importante sobre a região é que, de acordo com o Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), existem no perímetro irrigado do Jaguaribe-Apodi, cerca de 231 pequenos produtores e 20 empresas dedicadas a fruticultura.

Portanto, grande parte da agricultura da região é familiar. Devido à falta de Infraestrutura e da mão de obra qualificada por parte da população, os casos de contaminação por agrotóxicos vêm crescendo nesta região (SOARES *et al.*, 2020).

A ênfase negativa ao uso dos agrotóxicos está relacionada ao seu enorme potencial de contaminação do ambiente e de propagação de doenças aos seres humanos, se tornando uma enorme preocupação no âmbito da saúde pública (CASSAL *et al.*, 2014). Os agrotóxicos, apesar da ação bem sucedida no combate a pragas, doenças e ervas daninhas na agricultura, geralmente permanecem na forma de resíduos nas plantas, frutos e solos onde foram aplicados (EDWARDS, 2013). Dentre os agrotóxicos, alguns apresentam elevada hidrofobicidade e reatividade baixa no meio ambiente, o que leva esses compostos a se acumularem ou bioconcentrarem nos tecidos dos organismos vivos. A falta de uma via eficiente para a degradação desses compostos, juntamente com a sua hidrofobicidade, leva ao acúmulo em organismos vivos, como peixes, anfíbios etc.

1.2 Anuros

Os anuros são espécies de anfíbios comumente conhecidas como sapos, rãs e pererecas e que compõem a ordem anura. Uma de suas muitas peculiaridades é que boa parte da sua vida acontece em lagos e riachos como um peixe e, posteriormente, passam a viver em terra. Por este motivo é dito que estas espécies possuem ciclo de vida bifásico (WOEHL JÚNIOR; WHOEL, 2008). No mundo, existem mais de 7285 espécies que apresentam uma grande variedade de cor, tamanho e forma (AMNH, 2020). Na Figura 1 são apresentadas algumas espécies de anfíbios registradas na região do médio Rio Jaguaribe, Estado do Ceará, nordeste do Brasil, bem como os seus nomes científicos.

Figura 1. Espécies de anuros registrados na região do Médio Rio Jaguaribe, Ceará. A) *Rhinella granulosa* (AAGARDA 10216); B) *Rhinella jimi* (AAGARDA 10292); C) *Corythomantis greening* (AAGARDA 10391); D) *Dendropsophus nanus* (AAGARDA 10276); E) *Hypsiboas raniceps* (AAGARDA 10404); F) *Phyllomedusa nordestina* (indivíduo não coletado).



Fonte: adaptado de (SANTANA et al. 2015).

Os anuros desempenham um papel de grande importância no ambiente para que haja um equilíbrio na natureza. Além de controlarem a população de insetos e de outros animais invertebrados, evitando assim proliferação de diversas doenças como a dengue, febre amarela e malária, servem também de alimento para muitas outras espécies (répteis, aves e mamíferos) (WOEHL JÚNIOR; WOEHL, 2008). Entretanto, as populações de anuros vem apresentando um grande declínio em várias partes do mundo, o que pode estar relacionado a diversos fatores, tornando-os um dos grupos tetrápodes (vertebrados terrestres) mais ameaçados da atualidade. Este declínio é ainda mais preocupante quando ocorre em regiões de alta riqueza e endemismo no planeta, como no caso do Brasil (TOLEDO et al., 2010). Entre os fatores relacionados ao declínio dramático dessas espécies em várias partes do mundo, a perda dos seus habitats tem sido o mais importante para este processo (MANN et al., 2009; RELYEA; SCHOEPPNER; HOVERMAN, 2005; SPARLING; FELLERS, 2009; GENDRON et al., 2003). No entanto, a presença de substâncias químicas introduzidas em seus habitats onde não eram previamente encontradas e

contra as quais as populações de anfíbios não desenvolveram uma defesa imunológica eficaz é o segundo principal motivo para esta diminuição (MANN *et al.*, 2009; RELYEA; SCHOEPPNER; HOVERMAN, 2005).

Uma grande parte do ciclo de vida dos anfíbios ocorre em lagoas, rios, riachos e piscinas temporárias que são frequentemente associadas às áreas agrícolas que recebem uma alta carga de agrotóxicos (JOFRE; ANTÓN; CAVIEDES-VIDAL, 2008). Portanto, algumas espécies de anuros que habitam esses ambientes podem estar expostas aos efeitos tóxicos dos resíduos de agrotóxicos. Os agrotóxicos podem ter muitos efeitos adversos nos anfíbios, incluindo diminuição do crescimento e das taxas de desenvolvimento, aumento da incidência de anormalidades externas, potencial reprodutivo prejudicado e, mais drasticamente, a morte (SPARLING; FELLERS, 2009). Apesar da ligação potencial entre o declínio da população de anfíbios e o aumento do uso de agrotóxicos ter sido relatado em alguns trabalhos na literatura (MANN *et al.*, 2009; RELYEA; SCHOEPPNER; HOVERMAN, 2005), estudos que indiquem essa relação direta ainda são incipientes. A presença de resíduos de agrotóxicos no tecido dos anuros pode ser um fator fundamental para confirmar a relação entre o desaparecimento dos anfíbios e a contaminação dos habitats por insumos químicos de finalidade agrícola.

A detecção e a quantificação de resíduos de agrotóxicos nos tecidos de anuros requerem uma etapa invasiva, de retirada de parte do tecido do animal, que normalmente ocorre *post mortem* do animal. Por este motivo, são escassas as quantidades de amostras. Neste trabalho, foi desenvolvido um método para detectar e quantificar resíduos de agrotóxicos em tecidos de duas espécies de anuros: *Leptodactylus macrosternum* e *Scinax x-signatus*. As espécies foram coletadas em Tabuleiro do Norte, região do Baixo Rio Jaguaribe no Ceará (Figura 2), que é um importante polo de agronegócio do estado. As duas espécies de anuros foram coletadas pela doutoranda Patrícia de Menezes Gondim, orientada do Prof. Dr. Paulo Cascon do Departamento de Biologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, onde parte das espécies foram coletadas em duas áreas que não foram expostas pela atividade agrícolas (Área I, UTM 24M 0594570, 9415959; Área II, UTM 24M 0587910, 9409430) e parte em duas áreas na qual é cultivado arroz, milho e banana com provável exposição direta a agrotóxicos (Área III, UTM 24M 0596531, 9423803; Área IV, UTM 24M 0598188, 9422750).

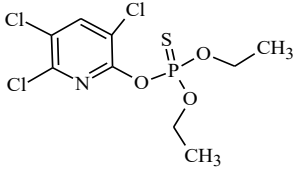
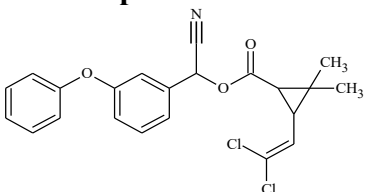
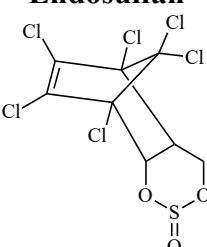
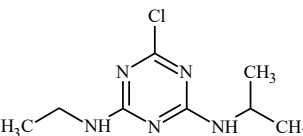
Figura 2. Cidade de Tabuleiro do Norte, Ceará. Curso do Rio Jaguaribe.



Os agrotóxicos selecionados para o estudo foram aqueles de uso mais frequente na região conforme (MILHOME *et al.*, 2009) e que, comprovadamente, interferem na reprodução e desenvolvimento dos seres vivos (SPARLING; FELLERS, 2009). Desta forma o clorpirifós, cipermetrina, endossulfan e atrazina foram os agrotóxicos selecionados para o estudo. As suas propriedades, juntamente com suas respectivas classes estão apresentadas na Tabela 2.

Para avaliar a distribuição dos agrotóxicos entre duas fases, uma orgânica e outra aquosa, empregou-se o coeficiente de partição octanol/água ($\log P$), que pode ser definido como a razão da concentração de uma determinada substância de interesse no equilíbrio, após sua dissolução em um sistema que apresenta duas fases, uma orgânica e outra aquosa. Esta propriedade é bastante empregada na química para determinar a solubilidade de diversos compostos em determinados solventes (SILVA; FERREIRA, 2003). Os agrotóxicos clorpirifós, atrazina, endossulfan e a cipermetrina apresentam valores de $\log P$ elevados, sendo considerados mais hidrofóbicos. Esta característica de partição dos agrotóxicos é importante para definir o processo de preparação da amostra, uma vez que os agrotóxicos podem ficar retidos na matriz da amostra e não serem adequadamente extraídos para posterior quantificação e/ou identificação.

Tabela 2. Propriedades e estruturas químicas dos agrotóxicos estudados neste trabalho.

Agrotóxicos	Fórmula molecular	Classe	Classe toxicológica	LogP	Massa molecular (g/mol)
Clorpirifós 	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	Inseticida e acaricida	II	4,96	350,6
Cipermetrina 	$C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$	Inseticida	II	6,60	416,3
Endosulfan 	$C_9H_6Cl_6O_3S$	Inseticida	I	3,83	406,9
Atrazina 	$C_8H_{14}ClN_5$	Herbicida	III	2,61	215,7

Fonte: (PUBCHEM, 2020)

Para a análise de compostos orgânicos, como os agrotóxicos, é necessária uma preparação de amostra cada vez mais eficiente e compatível com a agenda ambiental (NASIRI; AHMADZADEH; AMIRI, 2020). A preparação de amostra envolve uma etapa de isolamento do analito da matriz, normalmente realizada por meio de um processo de extração.

1.3 Métodos de extração

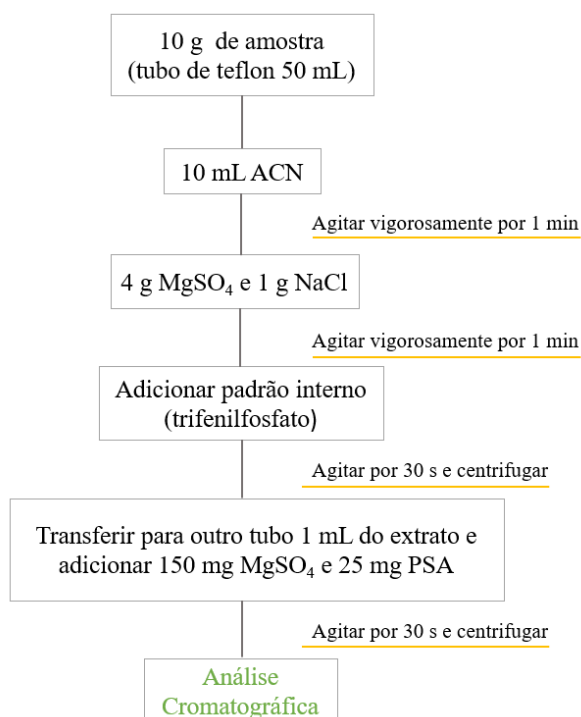
O primeiro passo para avaliar a presença dos resíduos de agrotóxicos nos tecidos de anuros é desenvolver um método de extração eficiente e repetitivo que leve em consideração o uso de pequenas dimensões de amostra. Se os resíduos estiverem presentes nos tecidos, devem estar em níveis de traços. Portanto, para realizar sua determinação exata e precisa é necessária uma etapa de preparação da amostra que inclua: (i) o isolamento dos analitos da matriz da amostra (extração); (ii) a remoção de potenciais interferentes do extrato contendo os analitos (limpeza ou *clean-up*),

e; se possível, (iii) a concentração dos analitos para níveis detectáveis pelos instrumentos de análise disponíveis (pré-concentração) (RIDGWAY; LALLJIE; SMITH, 2007). O ideal é que um mesmo método de preparação de amostra seja capaz de realizar simultaneamente as três etapas de forma mais simples, mais econômica e rápida possível.

Nos procedimentos em que se emprega extração, algumas propriedades são desejadas para que o método de preparação da amostra seja eficiente e obtenham-se resultados repetitivos (HERCEGOVÁ; DOMOTOROVÁ; MATISOVÁ, 2007). As diferenças das propriedades químicas e físicas dos compostos alvos de análise e a diversidade das matrizes, geram algumas adversidades durante o processo de desenvolvimento do método de extração. Nos últimos anos, ocorreu um rápido desenvolvimento de novos métodos de preparação de amostra, visando contornar problemas relacionados aos métodos de extração tradicionais, que apresentavam morosidade em suas etapas, elevado consumo de solvente e geração de grandes volumes de resíduos orgânicos tóxicos (RIDGWAY; LALLJIE; SMITH, 2007; CABRERA *et al.*, 2012; PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011). Dentre os métodos de extração desenvolvidos mais recentemente e que têm sido bem sucedidos na extração de agrotóxicos de diferentes matrizes, podem ser destacados: a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, *matrix solid-phase dispersion*) (CALDAS *et al.*, 2013); a extração assistida por micro-ondas (MAE, *microwave-assisted extraction*) (FANG *et al.*, 2012); o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) (ANASTASSIADES *et al.*, 2003); a extração sólido-líquido com partição à baixa temperatura (SLE-LTP, *solid-liquid extraction with low-temperature partitioning*) (MORAIS *et al.*, 2014; ARAÚJO *et al.*, 2016; SOARES *et al.*, 2015).

Dentre os métodos citados, o que tem se destacado com maior importância na análise de amostras sólidas ou semi sólidas, sendo considerado inclusive como o método mais adequado para análise de agrotóxicos em alimentos, é o método QuEChERS (SANTE, 2019). O método QuEChERS foi elaborado por Anastassiades e colaboradores (2003) para determinação de multirresíduos de agrotóxicos com intuito de superar algumas limitações de métodos já existentes. Assim, foi introduzido um procedimento que sintetizava, de certa forma, as características dos métodos de extração até então aplicados para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. O método QuEChERS sintetiza em sua sigla o que seriam as suas principais vantagens como: rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro. O fluxograma do método QuEChERS original proposto por Anastassiades e colaboradores (2003) está apresentado na Figura 3.

Figura 3. Fluxograma das etapas envolvidas no método QuEChERS original proposto por Anastassiades et al. (2003).



Fonte: Adaptado de (PRESTES et al., 2009)

De acordo com a Figura 3, método QuEChERS pode ser caracterizado como uma sequência de três etapas: extração, partição e limpeza.

- ✓ **Extração:** A escolha do solvente é uma etapa determinante no desenvolvimento de métodos de extração multirresíduos. Deve-se levar em consideração alguns aspectos, como diferentes polaridades, apresentar seletividade durante a extração, partição, compatibilidade com diferentes técnicas cromatográficas, baixo custo e segurança. Os solventes mais empregados em extração multirresíduos de agrotóxicos são: a acetonitrila (ACN), acetato de etila, metanol (MeOH) e acetona. Cada um desses solventes apresenta vantagens e desvantagens no processo de extração, devido à diversidade dos agrotóxicos e das matrizes analisadas. O procedimento de extração normalmente é realizado através da agitação (manual ou com auxílio de agitador vórtex) da amostra de interesse em contato com o solvente extrator orgânico.
- ✓ **Partição:** A etapa de partição tem sido cada vez mais empregada em métodos multirresíduos. Nesta etapa, ocorre a adição de sais para promover o efeito *salting-out*, que pode diminuir a solubilidade dos compostos na matriz e promover melhores porcentagens de recuperação. Esta etapa depende diretamente da natureza do solvente, pois a adição dos sais de partição varia de acordo com a polaridade do solvente empregado. Basicamente, a partição consiste

na adição de um sal secante, como MgSO_4 , que tem a finalidade de melhorar a recuperação dos resíduos de agrotóxicos polares, juntamente com um sal para tornar mais completa a separação das fases, como o NaCl .

- ✓ *Limpeza*: a etapa de limpeza (*clean-up*) é fundamental para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos por sistemas cromatográficos, além de evitar a presença de componentes não-voláteis da matriz que podem ficar aderidos no conjunto injetor-detector e na coluna cromatográfica, causando alterações na resposta e danos ao sistema. O sorvente empregado na etapa de limpeza atua como um filtro químico que retém coextrativos da matriz da amostra e, após a agitação e centrifugação, o extrato está pronto para análise. Os sorventes mais comumente empregados na etapa de limpeza são: PSA (*primary secondary amine*), octadecilsilano (C_{18}) e carvão grafitizado.

No trabalho original proposto por Anastassiades e colaboradores (2003) foram empregadas algumas matrizes alimentícias, como por exemplo, tomate, maçã e abobrinha para desenvolvimento do método. Na etapa de extração do método foi empregado como solvente a ACN, por extrair poucos materiais lipofílicos da amostra como ceras, gorduras, pigmentos e apresentar uma elevada recuperação de compostos de diferentes polaridades. Na etapa de partição foram empregados os sais de MgSO_4 e NaCl para promover o efeito *salting out*, ou seja, diminuir a solubilidade dos analitos polares na matriz e a quantidade de água na fase orgânica. A adição do MgSO_4 ocorre devido à sua capacidade de reduzir significativamente a fase aquosa, promovendo a partição dos agrotóxicos para a fase orgânica. Além disso, a hidratação do MgSO_4 é um processo exotérmico, fazendo com que, durante a etapa extração/partição a temperatura fique na faixa de 40-45 °C, favorecendo a extração de agrotóxicos polares. Já a adição de NaCl torna mais completa a separação das duas fases e menos água permanece na fase orgânica. Isto pode ajudar ou não na extração, pois se a fase orgânica se tornar cada vez menos polar, menos receptiva será aos compostos polares. Já na etapa de limpeza (*clean-up*) foi proposta uma mistura MgSO_4 e PSA, para promover uma limpeza efetiva do extrato e evitar efeito matriz, além de danos ao sistema cromatográfico devido à presença de componentes particulados da amostra. Os resultados obtidos no estudo dos autores foram altamente satisfatórios, apresentando boa recuperação dos analitos estudados e uma baixa quantidade de solvente orgânico foi utilizado, comparado aos métodos já existentes para extração de resíduos de agrotóxicos em alimentos (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Apesar de todos os benefícios do método QuEChERS, o mesmo deverá ser modificado para ser aplicado a amostras de tecido animal, visando reduzir a massa de amostra, de solventes e sorventes de limpeza. Como a disponibilidade de tecido do animal é relativamente baixa, cerca de

poucas centenas de miligramas, e visando não sacrificar uma grande quantidade de anuros durante as etapas de otimização do método QuEChERS, o mesmo foi miniaturizado. Além disso, durante as etapas de desenvolvimento e otimização do método foram empregadas outras fontes de tecidos adiposo e hepático, como por exemplo de tecidos de ave que podem ser adquiridas já abatidas em casas de carnes locais.

1.4 Validação de métodos analíticos

A confiabilidade dos resultados de um método analítico recém proposto deve ser aferida a partir de estudos de validação. Portanto, a validação de um método analítico deve ser realizada para fornecer evidências que o método é adequado para a finalidade pretendida. Todos os procedimentos/etapas de um método analítico devem ser validados, logo, a validação dentro do laboratório deve incluir a preparação da amostra, a medida da propriedade físico-química do analito realizada por uma técnica instrumental apropriada e a calibração da resposta (SANTE, 2020; WHO, 2017; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

O estudo de validação deve (i) demonstrar a concentração ou faixas de concentrações dos analitos, levando em consideração os efeitos da matriz das amostras testadas, coberta(s) pelo método proposto; (ii) fornecer uma caracterização estatística dos resultados de recuperação, e; (iii) indicar se a frequência de falsos positivos e negativos é aceitável. Quando o método é validado usando padrões analíticos adequados, os resultados dentro dos critérios de desempenho estabelecidos devem ser obtidos no mesmo material de amostra ou equivalente por um analista treinado em qualquer outro laboratório de análise de resíduos de agrotóxicos (WHO, 2017). Os requisitos gerais para a avaliação do desempenho de um método analítico em um estudo de validação podem ser assim resumidos (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002):

- ✓ Seletividade: refere-se à capacidade de um método analítico realizar a determinação de uma espécie de interesse, que está presente na matriz de estudo junto a componentes que podem interferir na sua análise. A seletividade é determinada comparando-se a matriz isenta dos analitos e a matriz fortificada com padrões dos analitos.
- ✓ Linearidade: refere-se à capacidade de um método analítico em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de uma determinada faixa de concentrações (faixa de trabalho). A linearidade do método analítico pode ser avaliada pela análise de um gráfico de resíduos produzidos por regressão linear das respostas nas concentrações da curva analítica ou pelo coeficiente de correlação linear (r) obtido a partir do ajuste do modelo linear.

- ✓ Faixa de trabalho: é o intervalo de concentrações do analito dentro do qual o método analítico será validado. A menor concentração da faixa de trabalho deverá necessariamente ser o limite de quantificação do método para o analito e a concentração mais elevada dependerá do teor médio do analito que se espera encontrar nas amostras.
- ✓ Exatidão: reflete o grau de concordância entre a média dos resultados individuais encontrados nas medidas experimentais por um método analítico e um valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão ou bias (tendência) é melhor expressa como o desvio em porcentagem bias do valor médio experimental em relação ao valor de referência (Equação 1). A exatidão de um método analítico pode ser determinada de três formas distintas: (i) pela análise de materiais de referência certificados empregando o método analítico; (ii) pela comparação de métodos, baseado na análise das amostras-alvo pelo método analítico e também por um método oficial (ou já previamente validado e publicado), e; (iii) pela análise de amostras em branco fortificadas com quantidades conhecidas do(s) analito(s) - ensaios de recuperação; ou (na ausência do branco) pela fortificação da amostra “contaminada” com uma quantidade(s) conhecida(s) de analito(s) – ensaios de adição e recuperação.

$$\%bias = \left(\frac{\bar{x} - X}{X} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 1}$$

Em que: $\bar{x}$ = valor médio experimental; X = valor de referência.

- ✓ Precisão: se refere ao grau de concordância mútua entre os resultados das análises que foram obtidos exatamente da mesma forma empregando o método analítico. Geralmente, a precisão é determinada pela medida independente de réplicas da amostra que foram submetidas ao método analítico. A precisão pode ser expressa pela estimativa do desvio-padrão (s) ou pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD, *relative standard deviation*) – Equações 2 e 3, respectivamente. No estudo da validação de um método analítico, a precisão poder ser avaliada em três dimensões distintas: (i) repetibilidade, que é a concordância entre os resultados de análises sucessivas do método analítico realizadas sob as mesmas condições em um curto intervalo de tempo: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento; mesmo local e mesmo lote de reagentes; (ii) precisão intermediária, que é a concordância entre os resultados de análises sucessivas de réplicas das amostras pelo método analítico, realizadas sob efeito de variações dentro do laboratório: diferentes analistas ou diferentes instrumentos ou diferentes dias, ou a combinação de dois ou mais destes fatores; (iii) reprodutibilidade, que se refere a um estudo de cooperação interlaboratorial, no qual diferentes laboratórios aplicarão o método analítico proposto para a determinação dos analitos nas amostras-alvo, considerando diferentes operadores, equipamentos, marcas de reagentes, lotes de reagentes etc.

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

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

Em que: x_i é uma medida individual; $\bar{x}$ é a média das medidas experimentais; n é o número de medidas realizadas; s é o desvio padrão absoluto.

- ✓ Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ): o LOD é a concentração mais baixa de um analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, pelo método analítico. O LOQ se refere a menor concentração do analito em uma amostra a qual pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis. O LOD e o LOQ podem ser determinados de três formas distintas: método visual, método baseado na razão sinal ruído ou método baseado na curva analítica (Equações 4 e 5).

$$LOD = 3 \times \frac{s}{a}$$
Equação 4

$$LOQ = 10 \times \frac{s}{a}$$
Equação 5

Em que: s é o desvio padrão da regressão linear e a é o coeficiente angular da curva analítica.

- ✓ Robustez: se refere à resistência dos resultados de um método analítico quando este é submetido a pequenas e deliberadas variações nas condições experimentais (que podem ocorrer durante as análises de rotina).

A validação dos métodos realizada neste trabalho seguiu o documento de orientação para validação de métodos analíticos para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos e rações proposto pela comunidade europeia (SANTE, 2020). Este guia foi escolhido por ser específico para a análise de resíduos de agrotóxicos e por se tratar de procedimentos e critérios de aceitação bem definidos para avaliação das figuras de mérito dos métodos analíticos.

Neste trabalho, foram desenvolvidas duas metodologias para determinação de resíduos de agrotóxicos em tecidos adiposo e hepático de anuros. Para a preparação da amostra foi otimizado o método QuEChERS visando sua miniaturização para compatibilizar com a dimensão da amostra e empregando tecidos adiposo e hepático de frango, adquiridos em casa de carnes local para evitar a eutanásia adicional de anuros. A quantificação dos resíduos dos agrotóxicos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos (HPLC-DAD, *high-performance liquid chromatography with diode array detector*).

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver e otimizar duas metodologias para a determinação de resíduos de agrotóxicos em tecidos adiposo e hepático de frango, empregando o método QuEChERS e quantificação dos agrotóxicos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de fotodiodos (HPLC-DAD).

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

- ✓ Desenvolver e otimizar o método QuEChERS para extração de resíduos de agrotóxicos de tecidos adiposo e hepático de frango;
- ✓ Miniaturizar o processo de extração visando a aplicação do método QuEChERS nas amostras dos tecidos;
- ✓ Validar os dois métodos de determinação de resíduos de agrotóxicos em tecidos de acordo como guia de validação de métodos analíticos proposto pela Comunidade Europeia (documento SANTE/12682/2019).

3 EXPERIMENTAL

Este trabalho foi desenvolvido em parceria com a doutoranda Patrícia de Menezes Gondim e com o prof. Dr. Paulo Cascon do Departamento de Biologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

3.1 Preparação das soluções padrão dos agrotóxicos

Todos os agrotóxicos empregados neste trabalho (atrazina, mistura de α -cipermetrina + β -cipermetrina + θ -cipermetrina + ζ -cipermetrina, clorpirifós e mistura de α -endossulfan + β -endossulfan) apresentaram grau de pureza analítico com 99 % de pureza mínima e foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemanha). É importante mencionar que o padrão da cipermetrina é constituído dos seus 8 isômeros, porém a cromatografia líquida no modo de fase reversa consegue separar e identificar apenas quatro isômeros não discriminando seus respectivos estereoisômeros cis e trans (KWON, 2011). Como solvente de dissolução foi utilizado metanol grau HPLC (JT Baker, Xalostoc, México). Foram preparadas soluções estoque para cada agrotóxico na concentração de 1000 mg L⁻¹, uma mistura estoque contendo todos os agrotóxicos na concentração de 100 mg L⁻¹ e soluções de trabalho foram preparadas a partir destas.

3.2 Preparação das soluções padrão dos agrotóxicos

Os tecidos hepático e adiposo do frango foram adquiridos de uma casa de carne localizada na cidade de Ituiutaba (MG, Brasil) e empregados como amostra teste para otimização dos processos de extração QuEChERS. Ambos os tecidos foram devidamente limpos (removendo sujeira e a pele) e, porções do tecido hepático e adiposo foram inseridas em um multiprocessador e processadas separadamente até total homogeneização, sendo armazenadas em tubos Falcon® em um congelador a -5 °C.

3.3 Otimização do método de extração QuEChERS

Inicialmente, uma pesquisa sobre o método QuEChERS original proposto por Anastassiades e colaboradores (2003) foi realizada para definir os fatores a serem otimizados de acordo com os tipos de matrizes estudadas. Devido à baixa quantidade de amostra dos anuros disponível, o objetivo da otimização do método foi miniaturizar as quantidades envolvidas nas

etapas do método QuEChERS. Inicialmente foi realizada a otimização para o tecido adiposo e, em seguida, para o tecido hepático de frango.

Uma mistura de fortificação (MF) contendo todos os agrotóxicos foi preparada para a realização dos estudos de otimização. Na Tabela 3 estão apresentadas as respectivas concentrações de cada agrotóxico na MF, que foram ajustadas devido às diferentes absorvidades molares de cada composto, uma vez que o detector empregado para o estudo foi o detector de arranjo de diodos.

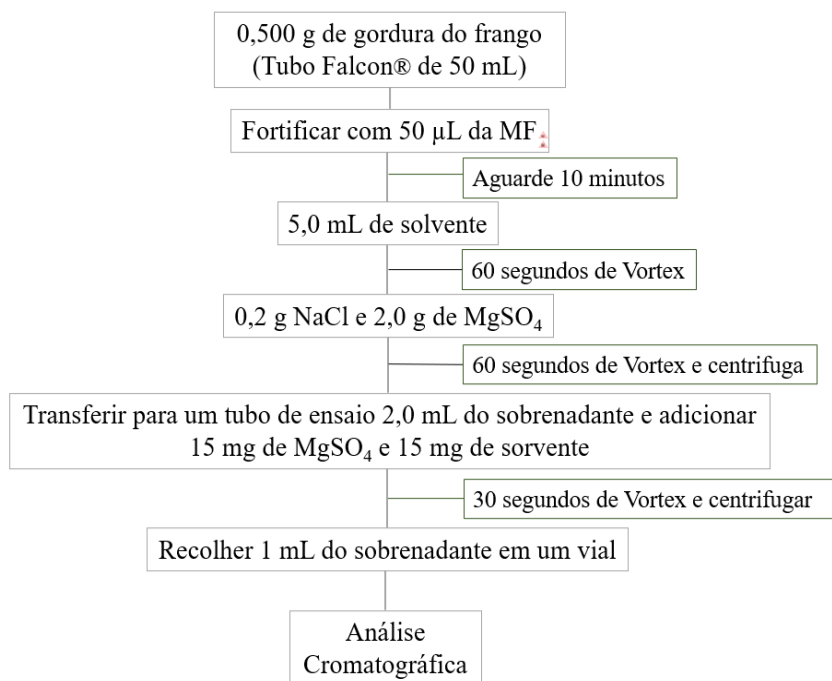
Tabela 3. Concentração dos agrotóxicos na mistura de fortificação para o estudo de otimização do método QuEChERS.

Agrotóxicos	Concentração (mg L⁻¹)
Atrazina	0,500
Endossulfan	3,500
Clorpirifós	2,500
Cipermetrina	2,500

3.3.1 Amostras de tecido adiposo

Na primeira etapa, foram avaliados alguns solventes e sorventes que são empregados durante o desenvolvimento do método QuEChERS original. Além disto, foram empregados sorventes produzidos pelo Laboratório de Pesquisa em Materiais de Separação (CroMat) com intuito de avaliar sua influência na etapa de limpeza. Portanto, foram realizados experimentos independentes ao variar algumas condições experimentais do método, visando recuperações dos analitos dentro do critério de aceitação do documento SANTE/12682/2019 (SANTE, 2020). Na Figura 4 é apresentado um fluxograma das principais etapas do método QuEChERS contendo as modificações das condições experimentais de extração.

Figura 4. Fluxograma geral do método QuEChERS submetido ao estudo de otimização para a extração dos resíduos de agrotóxicos de tecido adiposo.



Fonte: Próprio autor.

Para a otimização da extração QuEChERS inicialmente foram avaliados os solventes e sorventes apresentados na Tabela 4. Os sorventes Si(PDMS), Si(PGPMS) e Si(PDAS) foram produzidos pelo grupo de pesquisa CroMat (AGUIAR JÚNIOR, 2019; CARVALHO, 2014).

Tabela 4. Solventes e sorventes avaliados na otimização do método QuEChERS para extração de resíduos de agrotóxicos do tecido adiposo.

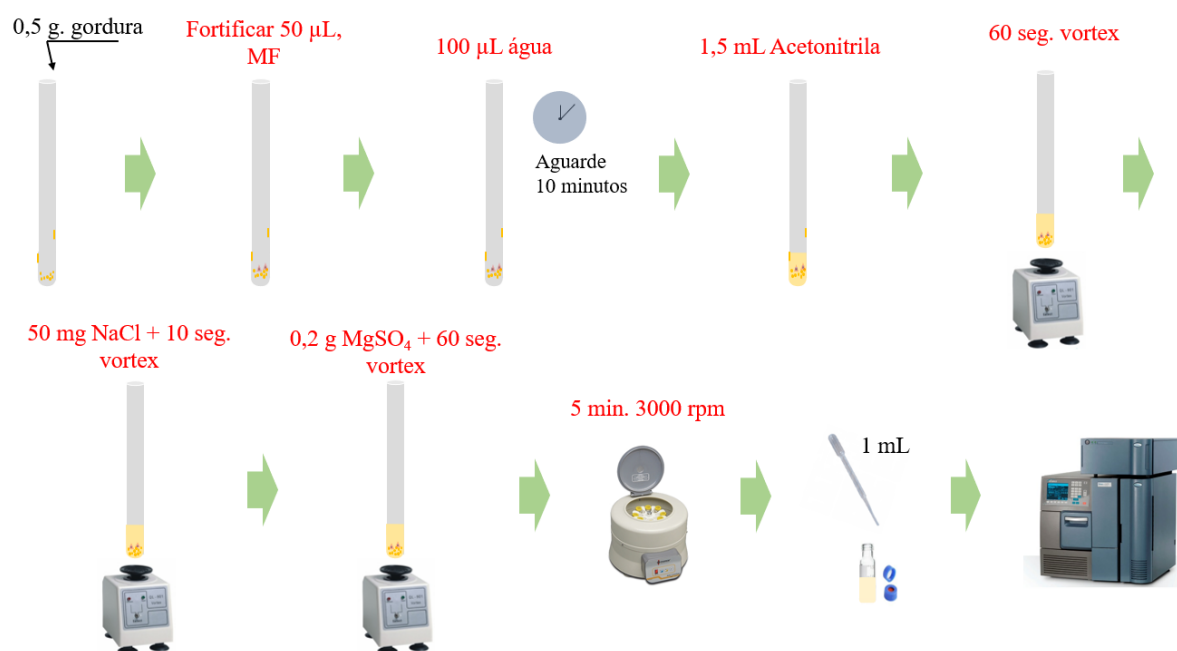
Solventes	Sorventes
MeOH	PSA
Acetona	C ₁₈
Acetonitrila	Carvão ativo
Acetato de etila	Si(PDMS)
	Si(PGPMS)
	Si(PDAS)

Além dos solventes e sorventes apresentados na Tabela 4, a extração QuEChERS foi avaliada em uma nova condição, com o solvente de melhor resultado de recuperação, empregando diferentes massas de sorventes de limpeza e sem o uso de sorventes na etapa de limpeza.

O procedimento final otimizado do método QuEChERS miniaturizado foi realizado conforme descrito. Foram pesados em tubos de ensaio de 5 mL 0,50000 g de tecido adiposo de frango. Em seguida, foram adicionados 50 µL da MF e 100 µL de água destilada, deixando em

repouso por 10 minutos para o contato direto dos agrotóxicos com a matriz da amostra. Feito isto, foram adicionados 1,5 mL de solvente (conforme Tabela 4), agitando-se em vórtex por 60 segundos. Posteriormente, foram adicionados 50 mg de NaCl, agitando a mistura em vórtex por 10 s. Foram acrescentados 200 mg de CaSO₄, agitando em vórtex por cerca de 60 s. A mistura foi centrifugada à 3000 rpm por 5 min. Por fim, foi transferido 1,00 mL do sobrenadante para um vial e levado para análise no HPLC-DAD. Na Figura 5 é apresentado um esquema ilustrativo com todas as etapas envolvidas para a otimização do método de extração dos agrotóxicos das amostras de tecido adiposo.

Figura 5. Esquema com todas as etapas envolvidos no processo de extração otimizado para gordura sem etapa de limpeza.



Fonte: Próprio autor.

3.3.2 Amostras de tecido hepático

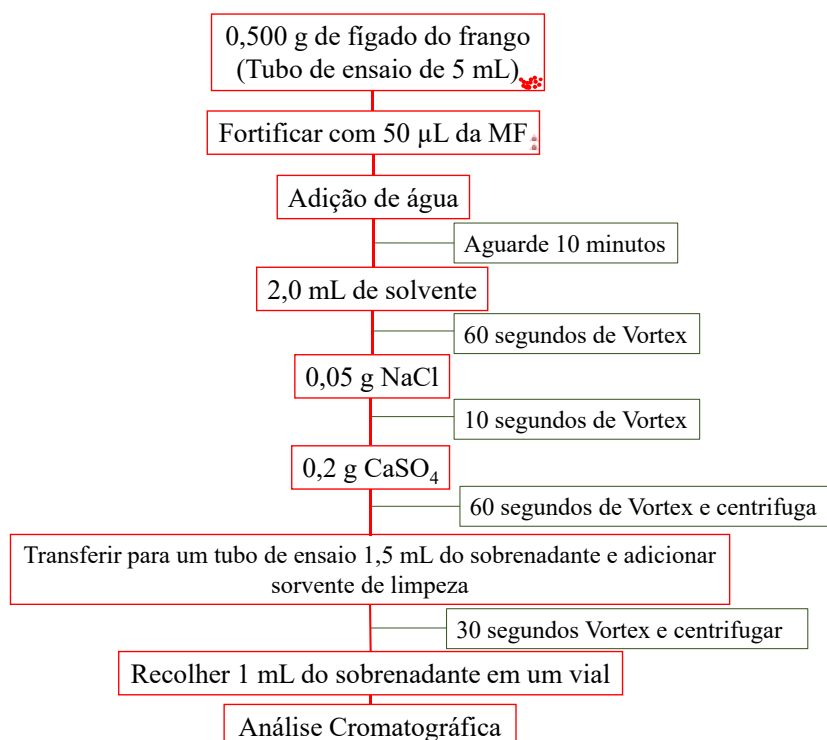
Para otimizar a extração QuEChERS dos resíduos de agrotóxicos da matriz de tecido hepático, foram realizados 6 experimentos independentes variando algumas condições conforme indicado na Tabela 5.

Tabela 5. Variações realizadas nos experimentos visando a condição ideal do método de extração de resíduos de agrotóxicos de amostras de tecido hepático.

Exp.	Solvente	100 µL água	Sorventes
01	ACN	-	30 mg PSA
02	ACN	Sim	30 mg PSA
03	ACN	-	15 mg PSA + 15 mg C ₁₈
04	MeOH	-	15 mg PSA + 15 mg C ₁₈
05	Acetato de etila	-	15 mg PSA + 15 mg C ₁₈
06	ACN:Acetato de etila (90:10)	-	15 mg PSA + 15 mg C ₁₈

Na Figura 6 é apresentado um fluxograma das principais etapas realizadas no processo de otimização da extração.

Figura 6. Fluxograma geral dos 6 experimentos realizados na otimização do método para a matriz do fígado do frango caipira.



Fonte: Próprio autor.

O procedimento realizado para a otimização do método de extração QuEChERS dos resíduos de agrotóxicos em amostras de tecido hepático foi similar ao realizado para o tecido adiposo. No entanto, observou-se que para o tecido hepático não era possível realizar o processo sem a etapa de limpeza do extrato, uma vez que após a partição no método QuEChERS o extrato apresentava forte coloração e ainda com a possível presença de substâncias provenientes do tecido.

A Figura 7 ilustra o processo de extração QuEChERS otimizado para a extração dos agrotóxicos do tecido hepático.

Figura 7. Ilustração do processo de extração de resíduos de agrotóxicos de amostras de tecido hepático, utilizando o método QuEChERS.



Fonte: Próprio autor.

3.4 Análises cromatográficas dos extratos por HPLC-DAD

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência Waters modelo Alliance e2695, acoplado ao detector de arranjo de diodos, empregando uma coluna de aço inox de 150 mm × 4,6 mm recheada com partículas de 3,5 µm de fase estacionária (FE) X-Select C₁₈ HSS (marca Waters). A fase móvel (FM) empregada foi composta de MeOH grau HPLC (JT Baker, Xalostoc, México) e água ultrapura com resistividade superior a 18,2 MΩ cm em purificador Master System MS200 (Gehaka, São Paulo, Brasil). Ambos os solventes da fase móvel foram filtrados separadamente, empregando um filtro Millex® (Millipore) em um sistema de filtração característico de preparação de fase móvel. Em seguida, os solventes foram transferidos para frascos de vidro e desgaseificadas em banho ultrassom por 15 min. Após todo processo de preparação da FM, os solventes foram levados para o sistema HPLC.

Primeiramente, a fim de obter as condições ótimas de análise (composição da fase móvel ideal, modo de eluição, vazão de fase móvel etc.) e os comprimentos de ondas para quantificação dos compostos, foi injetada uma mistura contendo todos os agrotóxicos na concentração de 10 mg

L⁻¹. Posteriormente, nas condições otimizadas, foram injetados individualmente os padrões dos agrotóxicos na concentração de 10 mg L⁻¹ para realizar a devida identificação através da comparação dos tempos de retenção (t_R) com os picos no cromatograma da mistura.

Para realizar as análises dos extratos obtidos através da extração QuEChERS empregando os solventes acetona e acetato de etila, foi necessário realizar uma etapa prévia para a evaporação do solvente extrator em fluxo de argônio para compatibilizar o extrato com a fase móvel. Após a evaporação do solvente, o resíduo presente no vial foi ressuspenso com 1 mL de metanol e filtrado empregando filtro Millex® com 0,22 µm. Por fim, o filtrado obtido foi levado para o HPLC-DAD nas condições previamente obtidas, realizando as devidas análises.

3.5 Preparação das curvas analíticas

A partir das soluções estoque e de trabalho, 1000 e 50 mg L⁻¹, respectivamente, de cada agrotóxico, foram preparadas curvas analíticas em solvente (método do padrão externo), na amostra que foi submetida ao processo de extração otimizado (método da calibração na matriz) e com adição no extrato (método da adição padrão) para ambas as matrizes.

3.5.1 Método do padrão externo

Em um balão volumétrico de 5 mL foram adicionados diferentes volumes de cada padrão dos agrotóxicos a partir das soluções de trabalho (50 mg L⁻¹), completando o volume restante com acetonitrila. As concentrações das soluções dos padrões dos agrotóxicos na curva analítica preparada em acetonitrila variaram de 0,01 a 0,50 mg L⁻¹ para a atrazina, 0,07-0,35 mg L⁻¹ para o α -endossulfan e para o β -endossulfan, 0,05-0,25 mg L⁻¹ para clorpirifós e para os isômeros α -, β -, θ - e ζ -cipermetrina.

3.5.2 Método da adição padrão

Para a preparação da curva analítica pelo método da adição padrão, amostras dos tecidos adiposo e hepático isentas dos agrotóxicos foram submetidas à extração QuEChERS, seguindo o método previamente otimizado. Os extratos obtidos foram empregados como solvente para a preparação das curvas analíticas para cada agrotóxico. A partir das soluções de trabalho de cada agrotóxico na concentração de 50 mg L⁻¹ foram preparados 5 mL de uma mistura dos agrotóxicos mais concentrada, correspondendo ao sexto ponto da curva analítica, empregando um balão

volumétrico de 5 mL e completando o volume restante com o extrato obtido do método QuEChERS para os tecidos hepático e adiposo. As concentrações das soluções dos padrões dos agrotóxicos na curva analítica preparada nos extratos de tecido adiposo e hepático variaram de 0,01 a 0,50 mg L⁻¹ para a atrazina, 0,07-0,35 mg L⁻¹ para o α -endossulfan e para o β -endossulfan, 0,05-0,25 mg L⁻¹ para clorpirifós, α -, β -, θ - e ζ -cipermetrina.

3.5.3 Método da calibração na matriz

Para a construção da curva analítica pelo método da calibração na matriz, foi realizada a fortificação do branco das amostras de tecido adiposo e tecido hepático com a solução de trabalho a 50 mg L⁻¹. As amostras fortificadas foram submetidas aos métodos de extração QuEChERS otimizados para o tecido adiposo e para o tecido hepático. Para a construção da curva analítica, foram realizadas diluições do extrato fortificado, completando o volume com ACN. As concentrações das soluções dos padrões dos agrotóxicos na curva analítica preparada em acetonitrila variaram de 0,01 a 0,50 mg L⁻¹ para a atrazina, 0,07-0,35 mg L⁻¹ para o α -endossulfan e para o β -endossulfan, 0,05-0,25 mg L⁻¹ para clorpirifós e para os isômeros α -, β -, θ - e ζ -cipermetrina.

3.6 Validação dos métodos desenvolvidos

Para realizar a validação de um método analítico é necessário avaliar se os resultados obtidos são confiáveis e se o desempenho é apropriado para a finalidade pretendida, neste trabalho, a determinação de resíduos de atrazina, isômeros da cipermetrina, isômeros do endossulfan e clorpirifós em tecidos hepático e adiposo de anuros. Para isto, é recomendável seguir um protocolo de validação com os procedimentos definidos para cada figura de mérito, levando em consideração seus critérios de aceitação. Neste trabalho o protocolo escolhido para o estudo de validação do método foi o Guia da Comunidade Europeia para Controle de Qualidade Analítica e Procedimentos de Validação de Métodos para Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos e Rações, documento SANTE/12682/2019 (SANTE, 2020). Os parâmetros analíticos para os dois métodos desenvolvidos que foram validados: seletividade, faixa de trabalho, linearidade, efeito matriz, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez.

3.6.1 Seletividade

A seletividade foi determinada comparando-se as respostas dos padrões dos agrotóxicos preparados em solvente e na matriz com os brancos das amostras. Assim, a eluição individualizada dos picos de cada agrotóxico, sem a coeluição de interferentes, seja proveniente da matriz do solvente ou de subprodutos do método, indicam a seletividade dos métodos.

3.6.2 Linearidade e faixa de trabalho

De acordo com o documento SANTE/12682/2019 (SANTE, 2020), a linearidade pode ser obtida pela injeção de pelo menos cinco concentrações diferentes de cada agrotóxico para a construção da curva analítica e o ajuste adequado de um modelo obtido a partir da regressão linear dos dados é confirmado por um coeficiente de regressão linear (r) maior que 0,99. Todas as curvas analíticas (método do padrão externo, da adição padrão e da calibração na matriz) foram construídas com pelo menos 5 concentrações diferentes, sendo a primeira concentração o valor do LOQ para cada agrotóxico e as demais concentrações foram: 5x, 10x, 20x, 30x e 50x o LOQ.

3.6.3 Efeito matriz

O efeito matriz nos métodos propostos foi calculado a partir da construção de curvas analíticas para os padrões dos agrotóxicos preparados em solvente e de curvas analíticas para os padrões dos agrotóxicos preparados nas matrizes de tecido adiposo e tecido hepático. O efeito matriz foi calculado através da Equação 6.

$$EM(\%) = \frac{S_m - S_s}{S_s} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Em que: S_s : coeficiente angular da curva em solvente; S_m : coeficiente angular da curva na matriz

Além do cálculo percentual do efeito matriz nos métodos propostos, esse foi avaliado também qualitativamente a partir do paralelismo das curvas analíticas preparadas em solvente e nas matrizes.

3.6.4 Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ)

A determinação do LOQ foi realizada através de injeções consecutivas de concentrações decrescentes dos agrotóxicos até a obtenção de um sinal repetitivo com variação da área de pico inferior a 20 % em termos de desvio padrão relativo (RSD, *relative standard deviation*). Para tal, foram injetadas concentrações cada vez menores até o desaparecimento do pico do agrotóxico no cromatograma. Em seguida, foram preparadas soluções nas concentrações imediatamente superiores as concentrações antes do desaparecimento dos picos dos agrotóxicos. Foram injetadas soluções em triplicata para cada solução dos agrotóxicos correspondentes aos possíveis LOQ e calculada a variação da área de pico. Os valores de LOQ foram confirmados quando a concentração dos agrotóxicos apresentaram $RSD < 20 \%$. A concentração inicial avaliada foi de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ para cada agrotóxico. Os valores de LOD corresponderam a 1/3 dos valores do LOQ.

3.6.5 Exatidão e precisão

A exatidão e a precisão foram avaliadas em duas concentrações diferentes conforme sugerido pelo documento SANTE/12682/2019 dentro da faixa de 1-10 x o limite de quantificação do método, 3x LOQ e 10x LOQ, em sextuplica (6x) para cada nível testado. As medidas de precisão foram avaliadas em duas dimensões: (i) repetibilidade – seis extrações para cada nível de fortificação das amostras de tecidos adiposo e hepático realizadas sob as mesmas condições em um mesmo dia; e (ii) reprodutibilidade dentro do laboratório (precisão intermediária) – seis extrações das amostras dos tecidos fortificadas em cada nível de concentração realizadas em três dias distintos por três analistas diferentes empregando os métodos QuEChERS otimizados. Em ambas as dimensões da precisão o desvio padrão relativo foi medido para avaliar o grau de repetibilidade e de reprodutibilidade dentro do laboratório dos métodos propostos. De acordo com o documento SANTE/12682/2019, o critério de aceitação para que um método analítico seja considerado preciso é de $RSD < 20 \%$.

A exatidão dos dois métodos propostos para a determinação dos agrotóxicos em tecidos adiposo e hepático foi medida através de ensaios de recuperação. As amostras foram fortificadas em dois níveis de concentração, 3x LOQ e 10x LOQ, e submetidos aos 2 métodos QuEChERS. O critério de aceitação estabelecido para que um método analítico seja considerado exato, de acordo com o documento SANTE/12682/2019, é que a recuperação dos compostos fique na faixa de 70-120 %. A porcentagem de recuperação dos agrotóxicos foi calculada de acordo com a Equação 7.

$$R(\%) = \frac{[agrotóxico]_{extraído}}{[agrotóxico]_{fortificado}} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

3.6.6 Robustez

A robustez dos métodos para determinação dos resíduos de agrotóxicos em tecidos adiposo e hepático foi avaliada utilizando o teste de Youden (YOUTEN; STEINER, 1975). Este teste permite determinar os fatores que possuem a maior influência sobre a resposta de um método analítico e, desta forma, indicar um controle mais rigoroso destes fatores para evitar variações na resposta, garantindo uma maior robustez do método analítico. Os fatores escolhidos devem ser aqueles passíveis de sofrerem variações durante uma análise de rotina empregando o método.

Para a determinação da robustez pelo teste de Youden foram realizados 8 experimentos avaliando 7 fatores simultaneamente em um típico planejamento fatorial fracionário 2^{7-4} (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). Os experimentos realizados consistiram da fortificação dos tecidos com concentração de 10x o LOQ para cada agrotóxico e, em seguida, a aplicação dos métodos QuEChERS otimizados para cada amostra. Os fatores e os seus níveis avaliados para o estudo da robustez dos métodos são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Matriz do planejamento de experimentos para a avaliação da robustez dos métodos analíticos propostos, empregando o teste de Youden.

Fatores	Experimentos								Variações	
	1	2	3	4	5	6	7	8	Nominal	Deliberado
Tempo Contato	A	A	A	A	a	a	a	a	10 min	12 min
Agitação	B	B	b	b	B	B	b	b	60 s	90 s
Sal (NaCl/CaSO ₄)	C	c	C	c	C	c	C	c	50/200 mg	60/240 mg
Solvente (marca)	D	D	d	d	d	d	D	D		
Vazão	E	e	E	e	e	E	e	E	1,0 mL min ⁻¹	0,8 mL min ⁻¹
FM (MeOH)	F	f	f	F	F	f	f	F	80 %	82 %
Temperatura	G	g	g	G	g	G	G	g	30 °C	35 °C

Letras em maiúsculo: valores originais do método otimizado; Letras em minúsculo: valores deliberadamente variados no método otimizado.

A avaliação da robustez do método foi realizada a partir do cálculo dos efeitos para cada fator variado nas condições experimentais. Os métodos propostos foram considerados robustos quando a variação da resposta para cada fator estudado foi inferior a 2 % da porcentagem de recuperação. Os efeitos encontrados para cada fator foram referentes as porcentagens de

recuperação, obtidos de acordo com os experimentos realizados pelo teste de Youden da Tabela 6, calculados através da Equação 8.

$$\text{Efeito } (A - a) = \bar{R}_A - \bar{R}_a \quad \text{Equação 8}$$

Em que: $\bar{R}_A$ é a média das respostas para A o fator mantido na condição original do método; $\bar{R}_a$ é a média das respostas para o fator a variado deliberadamente.

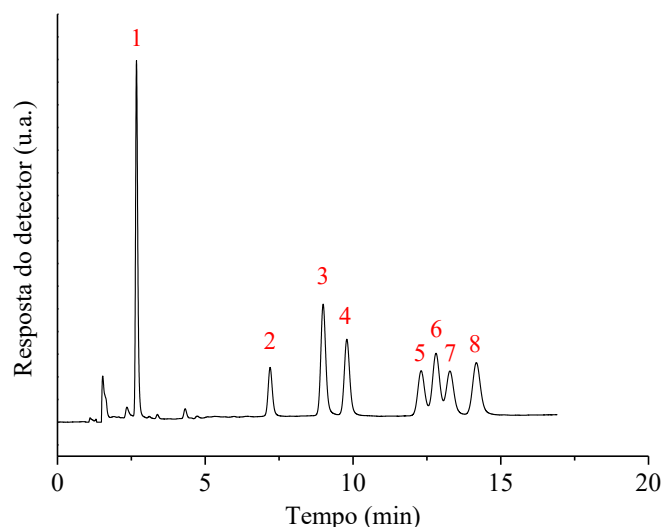
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização das condições cromatográficas de análise dos agrotóxicos

Todos os agrotóxicos estudados são absorventes de radiação eletromagnética na região do ultravioleta e, portanto, geram resposta no detector de arranjo de fotodiodos. Inicialmente foi injetada uma mistura contendo todos os agrotóxicos na concentração de 100 mg L^{-1} para a otimização da composição de fase móvel na condição de varredura espectral (registro de todos os comprimentos de onda simultaneamente à separação cromatográfica). A varredura espectral permitiu a definição dos comprimentos de ondas de análise dos agrotóxicos. A mistura dos padrões foi então submetida a análises sob diferentes condições de fase móvel até que se observasse a separação total dos picos dentro de um tempo total de análise mais curto possível. Dentre as condições avaliadas, a que gerou a melhor separação dos 8 agrotóxicos foi aquela contendo uma mistura de MeOH:H₂O (80:20, v/v), temperatura da coluna mantida em 30 °C, vazão da fase móvel de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, comprimento de onda de 220 nm e tempo total de análise de 20 min de corrida cromatográfica. Após a confirmação das condições ideais de análise, foram injetados individualmente cada padrão dos agrotóxicos na concentração de 100 mg L^{-1} , a fim de confirmar suas identidades através da comparação dos tempos de retenção (t_R) nos cromatogramas. Na Figura 8 é apresentado o cromatograma da separação ótima alcançada para a mistura dos agrotóxicos no comprimento de onda de 220 nm.

Como apresentado no cromatograma da Figura 8, a separação dos picos referentes aos agrotóxicos se mostrou bastante satisfatória, mesmo para os isômeros do endossulfan e da cipermetrina. Uma das vantagens de utilizar o detector de arranjo de diodos é a opção de habilitar a varredura na região do UV-Vis durante a corrida cromatográfica. Portanto, é possível identificar e quantificar cada composto, separadamente, no seu máximo de absorção, aumentando a sensibilidade do método.

Figura 8. Cromatograma da separação da mistura dos agrotóxicos. Fase móvel MeOH:H₂O (80:20, v/v), vazão de 1,0 mL min⁻¹; detecção DAD em 220 nm; coluna cromatográfica: X-Select C18 HSS. Identificação dos picos: (1) Atrazina; (2) α -endossulfan; (3) clorpirifós; (4) β -endossulfan; (5) α -cipermetrina; (6) β -cipermetrina; (7) θ -cipermetrina; (8) ζ -cipermetrina.



4.2 Otimização dos métodos de extração QuEChERS

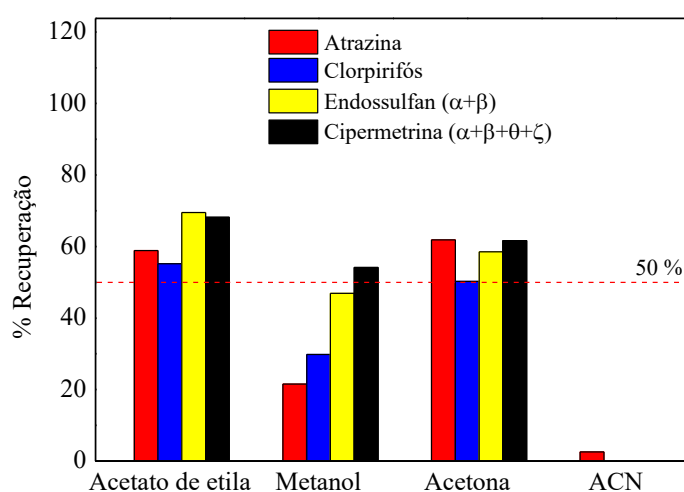
4.2.1 Amostras de tecido adiposo

A extração de resíduos de agrotóxicos é um processo laborioso para ser otimizado e validado. O primeiro passo antes de iniciar a otimização é avaliar o problema e selecionar um método de acordo com as propriedades da amostra, propriedade a ser medida, sempre buscando uma metodologia que seja rápida, menos laboriosa possível e que consuma a menor quantidade de solvente orgânico. O método QuEChERS além de ser simples, rápido e prático, consome um baixo volume de solvente orgânico e tem sido considerado o método adequado para extração de resíduos de agrotóxicos de alimentos (SANTE, 2020), sendo escolhido para este estudo.

Para avaliar os fatores que interferem diretamente na recuperação dos resíduos dos agrotóxicos, foi realizada uma pesquisa na literatura, sendo observado que para o método QuEChERS a escolha do solvente e do sorvente de limpeza são os únicos fatores passíveis de otimização de acordo com as características da matriz e dos agrotóxicos em estudo (PRESTES *et al.*, 2009). Deste modo, neste trabalho inicialmente foram avaliados os solventes mais comumente empregados nos métodos QuEChERS multirresíduos para determinação de agrotóxicos e outros compostos em diversas matrizes alimentícias ou não (KIM *et al.*, 2019). Os solventes testados foram o MeOH, a acetona, o acetato de etila e a ACN, utilizando como sorvente de limpeza o PSA, conforme proposto no método QuEChERS original. Outra mudança para o método QuEChERS

original realizada desde os primeiros testes foi a redução da massa de amostra e dos sais de partição, bem como do solvente de extração e do sorvente de limpeza. Houve mudança também do agente dessecante MgSO_4 para o CaSO_4 por este ter apresentado melhor separação de fase em testes preliminares. A esse método QuEChERS denominaremos a partir deste momento de mini-QuEChERS, em função da redução dos solventes e reagentes empregados. As recuperações obtidas para os agrotóxicos empregando o método mini-QuEChERS de acordo com o tipo de solvente extrator empregado estão apresentadas na Figura 9.

Figura 9. Avaliação do melhor solvente extrator para o método mini-QuEChERS na extração dos agrotóxicos de tecido adiposo.

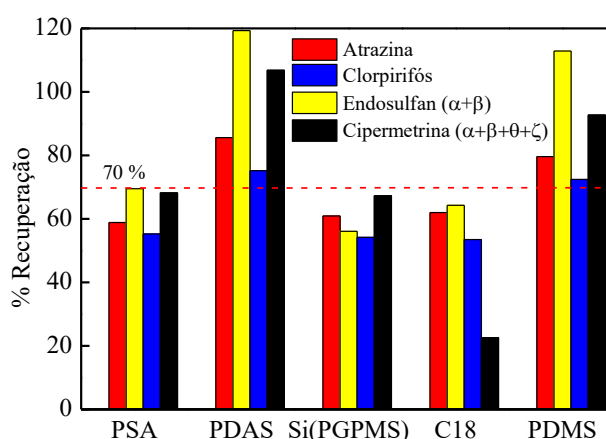


A reta tracejada na Figura 9 é correspondente ao valor de 50 % de recuperação dos agrotóxicos do tecido adiposo, empregando as condições modificadas do método QuEChERS. Portanto, analisando a porcentagem de recuperação dos analitos na Figura 9, pode-se afirmar que o solvente acetato de etila apresentou melhores percentuais de recuperação para os agrotóxicos, apesar de não estarem dentro de uma faixa recomendável para esta condição (70-120 %). Isto pode ser esperado, já que, o acetato de etila tem demonstrado ser um solvente com características universais e que vem sendo empregado na extração de diversos agrotóxicos de diferentes classes em diferentes matrizes (PRESTES *et al.*, 2009). Já o solvente ACN, que normalmente possibilita a extração de uma menor quantidade de coextrativos lipofílicos provenientes da amostra, como ceras, gorduras e pigmentos, e proporciona uma ampla extração de agrotóxicos com diferentes polaridades (PRESTES *et al.*, 2009), não apresentou recuperação para os agrotóxicos sob as condições preliminarmente avaliadas.

Após a escolha do solvente (acetato de etila), foi avaliado o melhor sorvente para a limpeza dos extratos no método mini-QuEChERS para os agrotóxicos estudados. Para isto, foi realizado

um estudo prévio da influência de determinados sorventes em determinados tipos de matrizes. O etilenodiamino-N-propil, por exemplo, é composto por uma amina primária secundária (PSA, *primary secondary amine*), que atua como um trocador aniônico, podendo interagir com diferentes compostos através de ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo e ou de efeito quelante, removendo assim diversos coextrativos presentes em diferentes matrizes. Entretanto, para matrizes mais gordurosas o PSA não tem se mostrado tão eficiente (CABRERA *et al.*, 2012). Além do PSA, foram testados sorventes produzidos no CroMat, tais como o Si(PDAS), Si(PGPMS), e o Si(PDMS), além de um sorvente C₁₈ comercial, avaliando a eficiência da remoção de coextrativos no processo de extração mini-QuEChERS. Na Figura 10 estão apresentadas as porcentagens de extração dos agrotóxicos para cada sorvente avaliado, empregando o acetato de etila como solvente extrator.

Figura 10. Avaliação de diferentes sorventes de limpeza para a extração de agrotóxicos de tecido adiposo, empregando o método mini-QuEChERS.

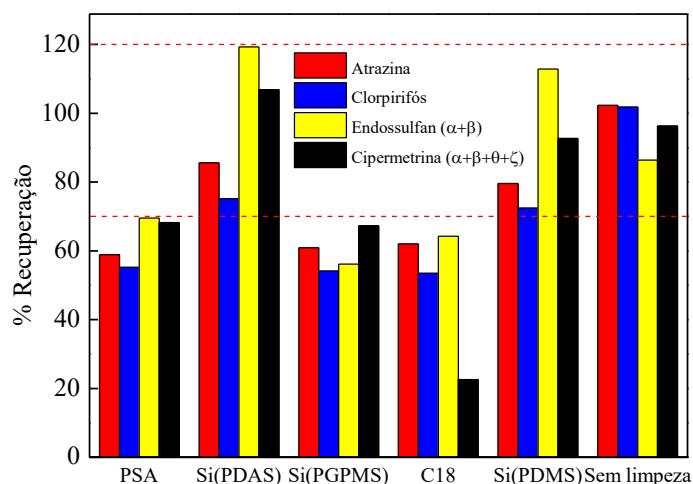


Para facilitar a visualização, na Figura 10 foi colocada uma reta tracejada correspondente ao valor de 70 % de extração dos agrotóxicos no tecido adiposo, sendo o valor inicial do intervalo de 70 - 120 % recomendável para a recuperação dos agrotóxicos (SANTE, 2020). Assim, os sorventes PSA e Si(PGPMS) apresentaram um valor de recuperação abaixo desta faixa como pode ser observado no gráfico da Figura 10. Já o C₁₈ (octadecilsilano), um sorvente comumente utilizado em matrizes com alto teor de gordura (> 2 %) por promover uma limpeza efetiva de compostos lipofílicos dos extratos (KIM *et al.*, 2019), não apresentou recuperações adequadas para os agrotóxicos do tecido adiposo, em especial para a cipermetrina o composto mais hidrofóbico entre os agrotóxicos estudados. Já o Si(PDAS) e Si(PDMS) apresentaram taxas de recuperação para os agrotóxicos dentro da faixa recomendável, podendo assim serem, quaisquer um dos dois,

escolhidos para a remoção dos componentes da matriz lipofílica. Neste estudo foi escolhido o Si(PDMS) como sorvente de limpeza.

Deste modo, após avaliar todas as condições realizadas nesta etapa, pode-se afirmar que as recuperações dos agrotóxicos, mesmo com os sorventes Si(PDAS) e Si(PDMS), estavam apresentando grandes variações entre as taxas de recuperação dos diferentes agrotóxicos, mesmo estando dentro do critério aceitável. Além disso, a incompatibilidade do acetato de etila com a fase móvel do sistema cromatográfico também gerava um empecilho durante as análises, uma vez que, os extratos eram submetidos a uma etapa de evaporação com gás argônio, aumentando o tempo de preparação da amostra e, possivelmente, provocando a maior variação das taxas de recuperação dos agrotóxicos. Desta forma, um novo estudo foi realizado visando adicionar um microvolume de água à matriz da amostra após a fortificação com os agrotóxicos e tentar recuperar um maior percentual dos agrotóxicos. A adição de 100 µL de água ultrapura após a fortificação foi sugerida uma vez que a matriz lipofílica do tecido adiposo apresenta um teor de umidade extremamente baixo, impedindo que durante a etapa de partição ocorra o processo de separação de fases de forma eficiente pela atuação dos sais CaSO_4 e NaCl . O NaCl , que possui a finalidade dentro do método QuEChERS de realizar o processo *salting-out*, só o consegue fazer na presença de água e, provavelmente não estava sendo possível com o pequeno volume disponível na matriz lipofílica. Outra mudança realizada foi adicionar primeiro o NaCl e, um minuto depois, adicionar o CaSO_4 na etapa de partição do método mini-QuEChERS e, assim, haver tempo de o NaCl agir antes do sal dessecante eliminar a fase aquosa do processo de extração. Desta forma, a extração em triplicata foi realizada empregando a acetonitrila como solvente extrator, adicionando 100 µL de água ultrapura após a fortificação das amostras de tecido adiposo e estabelecendo duas condições, a primeira avaliando novamente os sorventes de limpeza e uma segunda sem uso de sorvente de limpeza. Esta segunda condição foi avaliada após a observação visual de extratos mais limpos obtidos com a adição da água ultrapura. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 11.

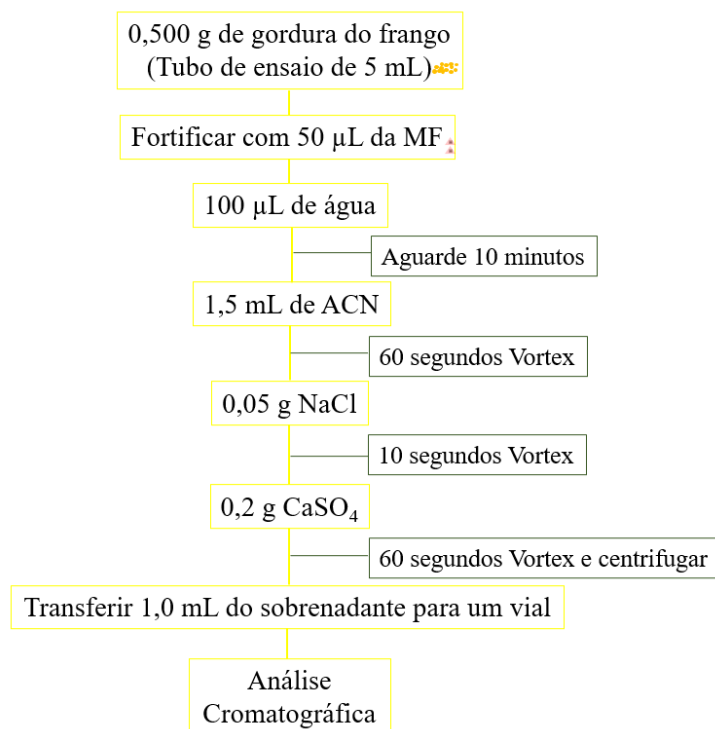
Figura 11. Avaliação da recuperação dos agrotóxicos de amostras de tecido adiposo, com e sem etapa de limpeza, após a inclusão de uma etapa de adição de água.



A etapa de limpeza é introduzida no método de extração com intuito de obter um extrato final mais limpo, ou seja, com a menor quantidade de interferentes possíveis promovendo mais robustez e confiabilidade para os resultados obtidos, uma vez que, componentes da matriz podem interagir irreversivelmente com a fase estacionária da coluna cromatográfica, alterando as respostas obtidas e requerendo um aumento na manutenção do equipamento (CABRERA *et al.*, 2012). Porém, no presente experimento, após a adição de água na etapa inicial do processo de extração mini-QuEChERS dos agrotóxicos do tecido adiposo, com ou sem a etapa de limpeza os cromatogramas obtidos apresentaram similaridade, ou seja, a presença de coextrativos provenientes da matriz não afetou os picos dos analitos. Além disto, após retirar a etapa de limpeza as porcentagens de recuperação dos agrotóxicos se mantiveram constante, na faixa de 86-102% de recuperação, dentro do indicado pelo documento SANTE/12682/2019 (SANTE, 2020).

Outro fato importante é que a adição de água na matriz durante o processo de extração também melhorou a recuperação dos analitos. Como a matriz apresenta um alto teor de gordura, a adição dos sais para promoção do efeito *salting-out* não ocorre de maneira significativa, devido à baixa quantidade de água na matriz lipofílica, como informado anteriormente. Porém, ao adicionar uma certa quantidade de água na matriz e promover agitação em vórtex por 10 segundos, ocorre a solvatação dos íons do NaCl dissolvido pelas moléculas de água, saturando a matriz com os íons dissociados do sal e disponibilizando os compostos mais polares presentes na matriz para migração para a fase orgânica extratora. Feito isto, foi adicionado CaSO_4 para eliminar a presença de água residual. Na Figura 12 é apresentado um fluxograma do método mini-QuEChERS otimizado para realizar a extração dos resíduos de agrotóxicos das amostras de tecido adiposo.

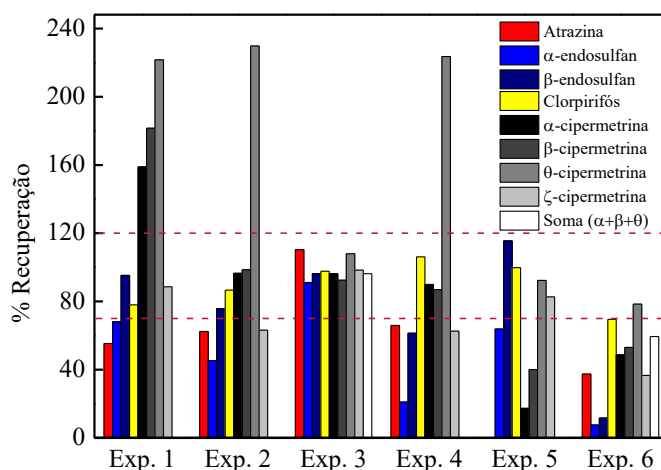
Figura 12. Método Mini-QuEChERS otimizado para extração de agrotóxicos de amostras de tecido adiposo.



4.2.2 Amostras de tecido hepático

Após definido o método de extração dos agrotóxicos de tecido adiposo, o mesmo foi modificado para otimizar a extração dos agrotóxicos em amostras de tecido hepático. Foram avaliados o melhor solvente extrator, a necessidade da adição de água ultrapura (uma vez que o fígado apresenta alto grau de umidade) e o melhor sorvente de limpeza (os extratos do tecido hepático apresentavam forte coloração) em seis experimentos conforme apresentado na Tabela 5. Na Figura 13 são apresentados os resultados de recuperação para cada experimento realizado para os agrotóxicos extraídos do tecido hepático, empregando o método mini-QuEChERS.

Figura 13. Avaliação das taxas de recuperação de agrotóxicos de tecido hepático na otimização do método mini-QuEChERS avaliando diferentes solventes extratores e sorventes de limpeza.

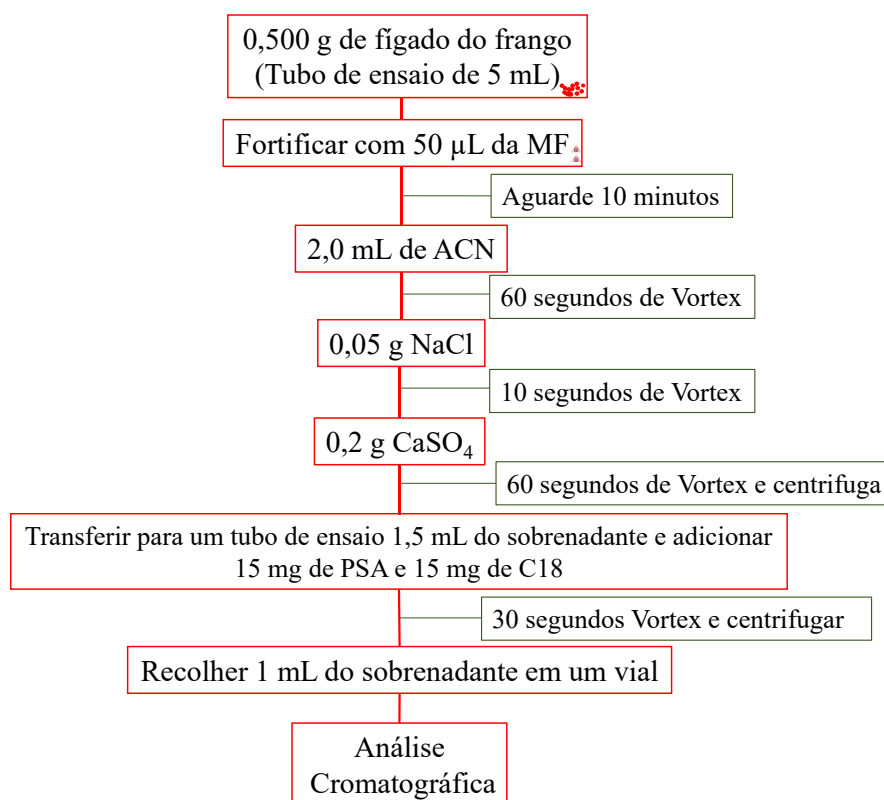


Para facilitar a visualização da faixa recomendável para as taxas de recuperação dos agrotóxicos foram colocadas duas retas tracejadas na Figura 13, correspondente ao intervalo de 70-120 % de extração. Desta forma, a partir do gráfico apresentado na Figura 13 foi possível observar que o experimento 03, que corresponde ao uso de ACN como solvente extrator, sem a adição de água à amostra de tecido hepático e empregando 15 mg de PSA e 15 mg de C₁₈ como sorventes de limpeza, apresentou uma recuperação satisfatória, no intervalo de 91-110 % de extração para todos os agrotóxicos, incluindo os isômeros. Esta condição foi definida como a ótima para a extração dos agrotóxicos do tecido hepático.

Para a matriz do tecido hepático, a etapa de limpeza foi fundamental para realizar a extração de forma eficiente dos agrotóxicos pelo método mini-QuEChERS, uma vez que os coextrativos provenientes da matriz interferiam diretamente na eluição dos picos cromatográficos. Os sorventes empregados para realizar o *clean-up* foram o PSA e o C₁₈. O PSA por ser uma amina primária secundária, eficiente na remoção de compostos hidrofílicos e o C₁₈ efetivo na remoção de compostos lipofílicos. Bandeira *et al.* (2014) empregaram esta mesma mistura de sorventes para realizar a extração de resíduos de agrotóxicos em amostras de leite, que apresenta um teor de gordura > 2 %, obtendo resultados de recuperação satisfatórios para todos os compostos estudados.

Na Figura 14 é apresentado o fluxograma do método mini-QuEChERS otimizado para a extração dos resíduos de agrotóxicos nas amostras de tecido hepático.

Figura 14. Fluxograma do método mini-QuEChERS otimizado para extração dos resíduos de agrotóxicos de tecido hepático.



Deste modo, os solventes extratores, as quantidades de sais para partição e do sorvente de limpeza foram otimizados para os tecidos adiposo e hepático, usando como teste material de frango, visando à recuperação dos resíduos dos agrotóxicos dentro da faixa recomendada pelo documento SANTE/12682/2019, de 70-120 %. Todos os agrotóxicos foram recuperados dentro da faixa recomendada empregando os métodos otimizados mini-QuEChERS. O método de extração QuEChERS foi miniaturizado, diminuindo consideravelmente as quantidades de amostra (redução de 95 %), solvente extrator (redução de 90 %), sais de partição (redução de 95 %) e sorventes de limpeza (redução de 40 %), mantendo bons percentuais de recuperação, além de resultar em uma metodologia mais limpa e mais econômica.

4.3 Validação dos métodos analíticos

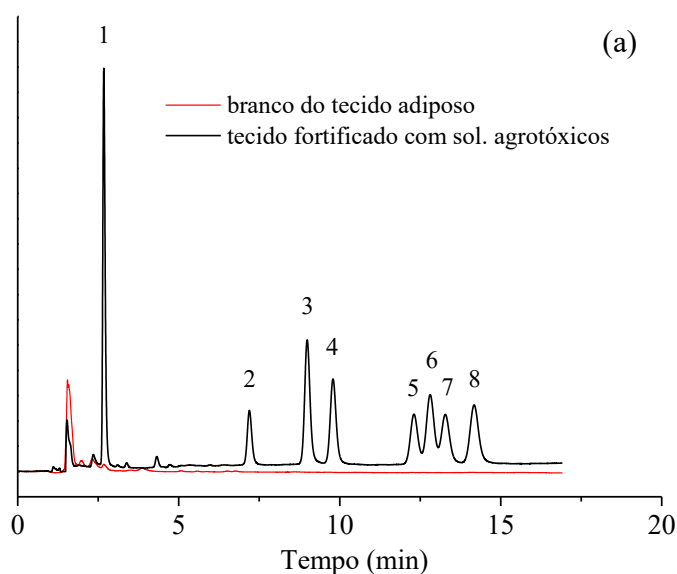
A validação de um método analítico é realizada por estudos sistemáticos produzidos no laboratório, indicando que o método atende às normas estabelecidas por agências reguladoras e órgãos de fiscalização nacionais e/ou internacionais. Esta validação pode ser averiguada através de parâmetros conhecidos como figuras de méritos. No presente trabalho, foi empregado o guia de validação da comunidade europeia documento SANTE/12682/2019 (SANTE, 2020), avaliando as

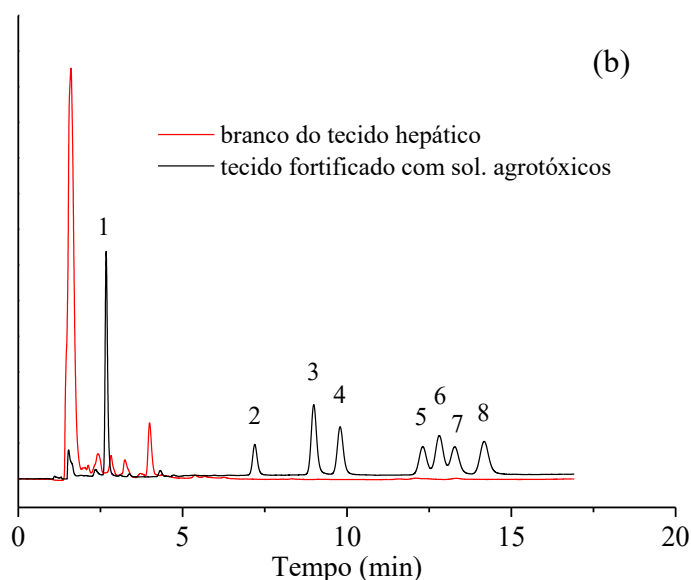
figuras de mérito: seletividade, linearidade e faixa de trabalho, LOD e LOQ, precisão, exatidão e robustez.

4.3.1 Seletividade

A seletividade dos métodos para a determinação de agrotóxicos em tecidos adiposo e hepático foi avaliada pela análise dos cromatogramas obtidos para a separação dos padrões dos agrotóxicos preparados em solvente e preparados nas duas matrizes, usando os brancos das amostras. Na Figura 15 são apresentados os cromatogramas da separação dos agrotóxicos nas amostras de tecido hepático e adiposo de frango.

Figura 15. Cromatogramas do branco da amostra de (a) tecido adiposo e de (b) tecido hepático comparados com cromatograma de uma solução padrão da mistura de agrotóxicos. FM MeOH:H₂O (80:20, v/v), vazão 1,0 mL min⁻¹; detecção 220 nm; coluna X-Select C18 HSS. Identificação dos picos: (1) atrazina; (2) α -endossulfan; (3) clorpirifós; (4) β -endossulfan; (5) α -cipermetrina; (6) β -cipermetrina; (7) θ -cipermetrina; (8) ζ -cipermetrina



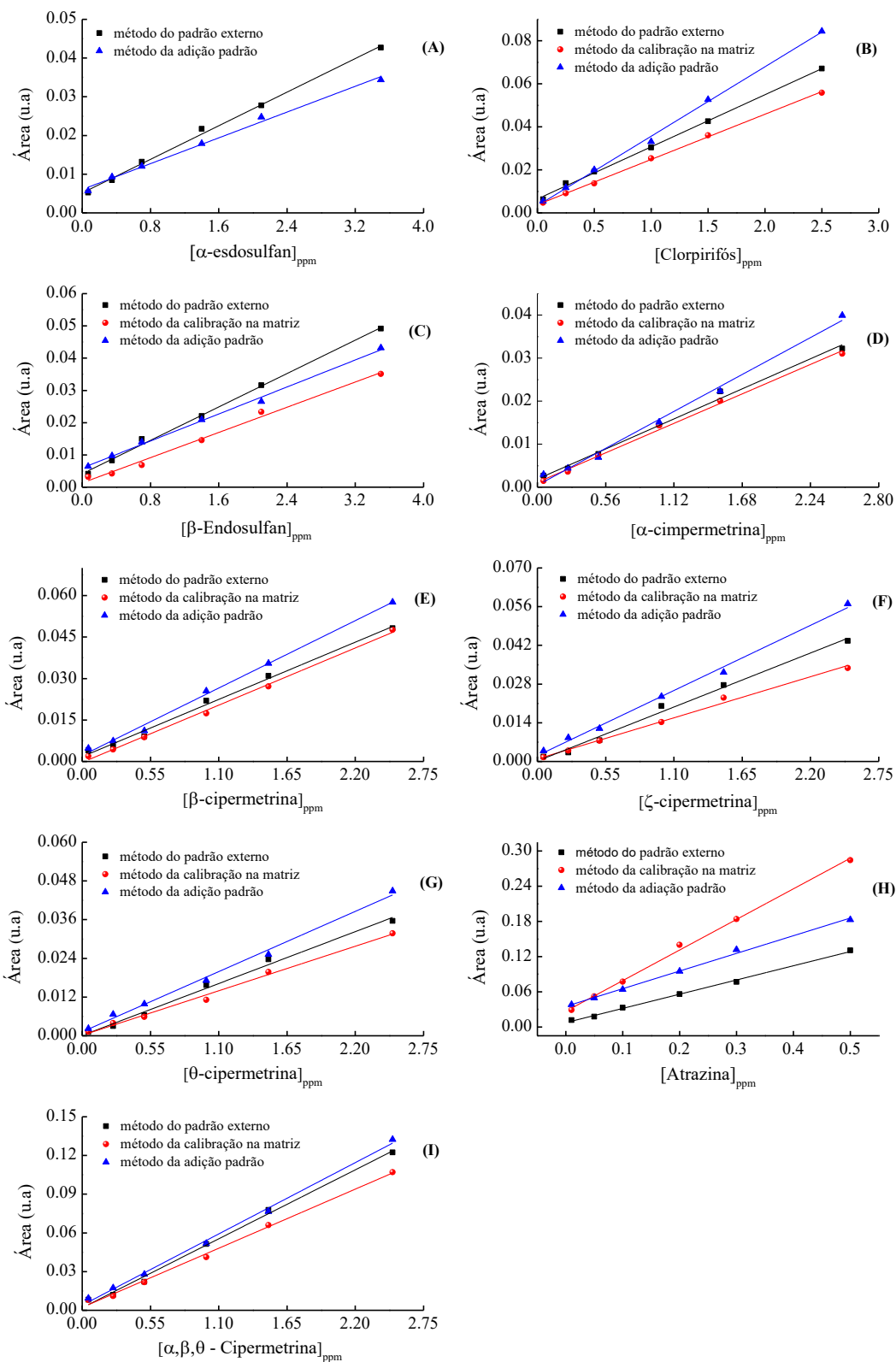


Na Figura 15 é possível observar que os agrotóxicos estudados são eluídos na forma de picos isolados no cromatograma sem a interferência de componentes das matrizes dos tecidos adiposo (Figura 15a) e hepático (Figura 15b). De acordo com o documento SANTE/12682/2019 o método pode ser considerado seletivo quando os analitos não são afetados pelos coextrativos das matrizes das amostras ou quando a interferência de coextrativos no pico do analito é inferior a 30 % da área total de pico do analito (SANTE, 2020). Desta forma, os dois métodos desenvolvidos podem ser considerados seletivos para a determinação dos oito agrotóxicos em tecidos adiposo e hepático.

4.3.2 Linearidade e faixa de trabalho

Para avaliar a linearidade dos métodos otimizados foram construídas três curvas analíticas sob diferentes métodos. A primeira curva foi construída em solvente pelo método do padrão externo, a segunda no extrato da amostra pelo método da adição padrão e a terceira curva obtida pela calibração na matriz, na qual a amostra fortificada foi submetida aos processos de extração otimizados. As curvas analíticas obtidas pelo método da adição padrão e calibração na matriz foram construídas para as duas matrizes das amostras, ou seja, para os tecidos adiposo e hepático. Na Figura 16 estão apresentadas as curvas analíticas obtidas para cada um dos agrotóxicos, pelos diferentes métodos de calibração, para as amostras de tecido adiposo.

Figura 16. Curvas analíticas dos agrotóxicos em estudo obtidas para o tecido adiposo sob diferentes métodos de calibração. Agrotóxicos: (A) α -endossulfan; (B) Clorpirifós; (C) β -endossulfan; (D) α -cipermetrina; (E) β -cipermetrina; (F) ζ -cipermetrina; (G) θ -cipermetrina; (H) atrazina; (I) α , β , θ -cipermetrina.



Para todos os agrotóxicos obtiveram-se as três curvas analíticas, exceto para o α -endossulfan, que não foi possível obter a curva analítica pelo método da adição padrão. Isto ocorreu devido a coeluição de algum componente da matriz juntamente com o analito nesta condição. A partir das curvas apresentadas na Figura 16, obtiveram-se os coeficientes de regressão linear e as equações das retas. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Dados referentes às curvas analíticas obtidas pelos métodos do padrão externo (■), da calibração na matriz (●) e da adição padrão (▲) para as amostras de tecido adiposo.

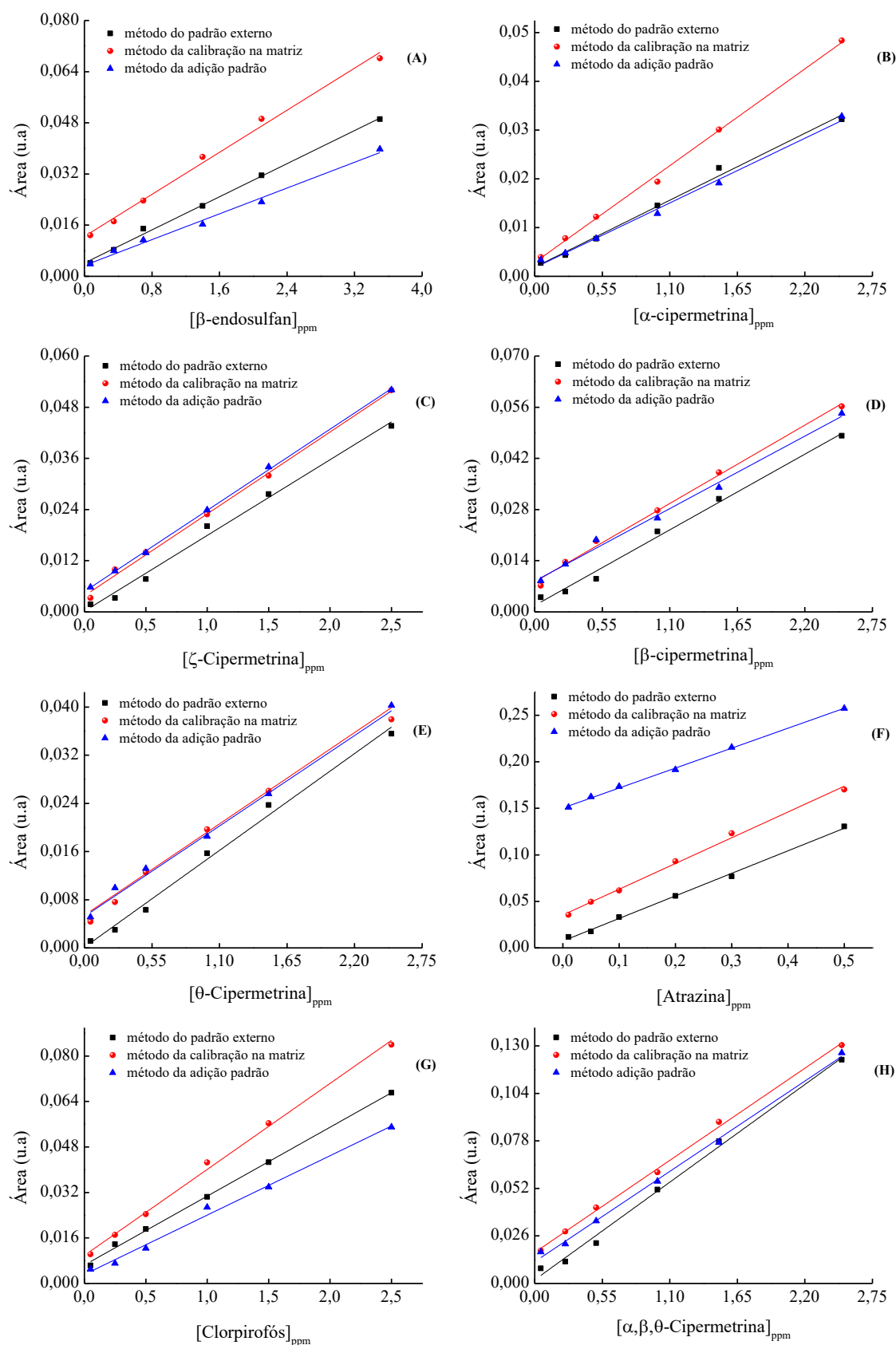
Agrotóxicos	Faixa de trabalho (ppm)	r	R ²	Equação da reta
Atrazina	0,01-0,50	0,9988	0,9971	■ $y = 0,242 x + 0,007$
		0,9989	0,9973	● $y = 0,522 x + 0,027$
		0,9983	0,9957	▲ $y = 0,301 x + 0,035$
α -endossulfan	0,07-3,50	0,9985	0,9962	■ $y = 0,011 x + 0,005$
		0,9972	0,9929	▲ $y = 0,008 x + 0,006$
β -endossulfan	0,07-3,50	0,9985	0,9964	■ $y = 0,013 x + 0,004$
		0,9962	0,9904	● $y = 0,010 x + 0,001$
		0,9984	0,9959	▲ $y = 0,010 x + 0,006$
Clorpirifós	0,05-2,50	0,9992	0,9980	■ $y = 0,024 x + 0,006$
		0,9996	0,9990	● $y = 0,021 x + 0,004$
		0,9991	0,9978	▲ $y = 0,032 x + 0,003$
α -cipermetrina	0,05-2,50	0,9968	0,9920	■ $y = 0,012 x + 0,002$
		0,9983	0,9957	● $y = 0,012 x + 0,001$
		0,9962	0,9906	▲ $y = 0,015 x + 0,0004$
β -cipermetrina	0,05-2,50	0,9966	0,9915	■ $y = 0,019 x + 0,002$
		0,9985	0,9963	● $y = 0,019 x - 0,0003$
		0,9980	0,9950	▲ $y = 0,022 x + 0,002$
θ -cipermetrina	0,05-2,50	0,9962	0,9905	■ $y = 0,015 x + 0,0001$
		0,9969	0,9922	● $y = 0,012 x + 0,0001$
		0,9974	0,9935	▲ $y = 0,017 x + 0,001$
ζ -cipermetrina	0,05-2,50	0,9961	0,9903	■ $y = 0,018 x + 0,0002$
		0,9971	0,9927	● $y = 0,013 x + 0,0009$
		0,9978	0,9946	▲ $y = 0,021 x + 0,002$
α , β , θ -cipermetrina	0,05-2,50	0,9977	0,9942	■ $y = 0,048 x + 0,002$
		0,9982	0,9954	● $y = 0,042 x + 0,002$
		0,9985	0,9964	▲ $y = 0,050 x + 0,004$

Como pode ser observado pelos valores obtidos para as curvas analíticas na Tabela 7, todos os coeficientes de regressão linear (r) ou de determinação (R²), obtidos pelo método dos mínimos quadrados, apresentam valores superiores a 0,99 que é o critério de aceitação do documento

SANTE/12682/2019 para a linearidade do método. Portanto, os modelos lineares obtidos para cada agrotóxico no tecido adiposo foram bem ajustados e serão empregados para a quantificação dos agrotóxicos após as extrações obtidas pelo método mini-QuEChERS otimizado.

A linearidade do método de determinação de agrotóxicos em tecido hepático também foi avaliada para cada agrotóxico, construindo curvas analíticas sob os três métodos de calibração. Na Figura 17 estão apresentadas as curvas analíticas obtidas para os agrotóxicos preparadas pelo método do padrão externo, da adição padrão e da calibração na matriz de tecido hepático.

Figura 17. Curvas analíticas dos agrotóxicos em estudo obtidas para o tecido hepático sob diferentes métodos de calibração. Agrotóxicos: (A) β -endossulfan; (B) α -cipermetrina; (C) ζ -cipermetrina; (D) β -cipermetrina; (E) θ -cipermetrina; (F) atrazina; (G) clorpirifós; (H) α , β , θ -cipermetrina.



As curvas analíticas foram obtidas para todos os agrotóxicos, exceto para o α -endossulfan, que não foi possível obter a curva analítica por adição padrão e calibração na matriz. Isto ocorreu devido a co-eluição de algum componente da matriz juntamente com o analito, ou seja, no mesmo tempo de retenção, inviabilizando sua análise. Para este composto no tecido hepático as recuperações serão calculadas pela curva analítica obtida pelo método do padrão externo. A curva analítica obtida pelo método da calibração na matriz para a atrazina apresentou um aumento significativo nos valores das áreas de pico, provavelmente devido a co-eluição de algum componente da matriz no mesmo tempo de retenção do analito. Neste caso, a curva analítica obtida pela calibração na matriz pode ser empregada na quantificação da atrazina para compensar potencial efeito matriz do tecido hepático. A partir das curvas apresentadas na Figura 17 foram extraídas as informações referentes aos coeficientes de regressão linear para cada curva analítica, as equações da reta e as faixas de trabalho para cada agrotóxico. Os valores obtidos para esses parâmetros estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Dados referentes às curvas analíticas obtidas pelos métodos do padrão externo (■), da calibração na matriz (●) e da adição padrão (▲) para as amostras de tecido hepático.

Agrotóxicos	Faixa de trabalho (ppm)	r	R ²	Equação da reta
Atrazina	0,01-0,50	0,9988	0,9971	■ $y = 0,242 x + 0,007$
		0,9981	0,9952	● $y = 0,277 x + 0,035$
		0,9993	0,9984	▲ $y = 0,214 x + 0,150$
α -endossulfan	0,07-3,50	0,9985	0,9962	■ $y = 0,011 x + 0,005$
β -endossulfan	0,07-3,50	0,9985	0,9964	■ $y = 0,013 x + 0,004$
		0,9970	0,9925	● $y = 0,016 x + 0,012$
		0,9961	0,9902	▲ $y = 0,010 x + 0,003$
Clorpirifós	0,05-2,50	0,9992	0,9980	■ $y = 0,024 x + 0,006$
		0,9986	0,9964	● $y = 0,030 x + 0,010$
		0,9967	0,9919	▲ $y = 0,021 x + 0,003$
α -cipermetrina	0,05-2,50	0,9968	0,9920	■ $y = 0,012 x + 0,002$
		0,9990	0,9974	● $y = 0,018 x + 0,003$
		0,9973	0,9933	▲ $y = 0,012 x + 0,002$
β -cipermetrina	0,05-2,50	0,9966	0,9915	■ $y = 0,019 x + 0,002$
		0,9977	0,9942	● $y = 0,019 x + 0,008$
		0,9967	0,9917	▲ $y = 0,018 x + 0,008$
θ -cipermetrina	0,05-2,50	0,9962	0,9905	■ $y = 0,015 x + 0,0001$
		0,9965	0,9913	● $y = 0,014 x + 0,005$
		0,9976	0,9940	▲ $y = 0,014 x + 0,005$
ζ -cipermetrina	0,05-2,50	0,9961	0,9903	■ $y = 0,018 x + 0,0002$

α, β, θ-cipermetrina	0,05-2,50	0,9985	0,9962	● $y = 0,019 x + 0,004$
		0,9998	0,9994	▲ $y = 0,019 x + 0,005$
		0,9977	0,9942	■ $y = 0,048 x + 0,002$
		0,9990	0,9976	● $y = 0,046 x + 0,017$
		0,9987	0,9968	▲ $y = 0,045 x + 0,012$

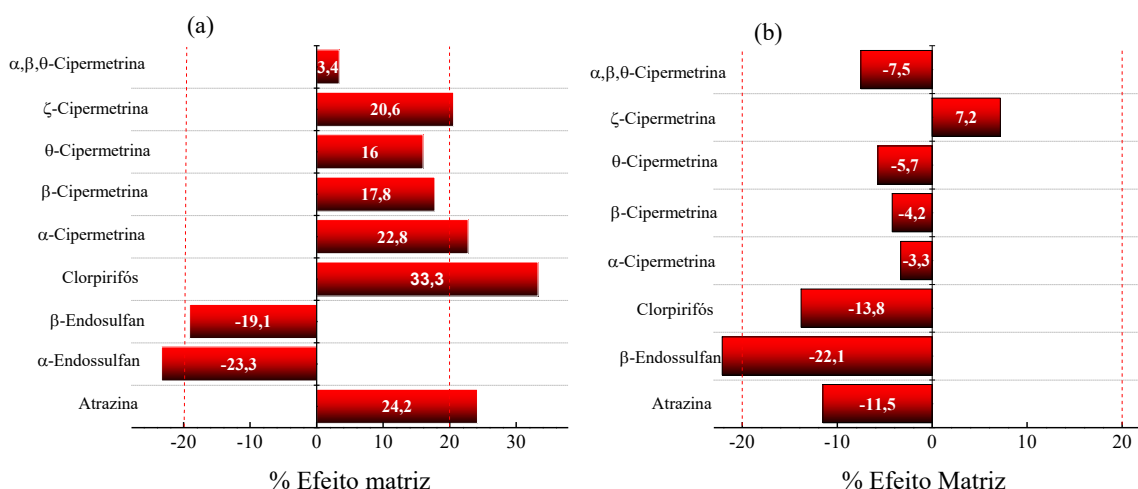
Conforme apresentado na Tabela 8, os coeficientes de regressão linear (r) e de determinação (R^2) obtidos das curvas analíticas para cada agrotóxico, independentemente do método de calibração empregado, foram superiores a 0,99, atendendo aos critérios de aceitação estabelecidos pelo documento SANTE/12682/2019 (SANTE, 2020). Portanto, é possível afirmar que os modelos lineares ajustados aos dados das curvas analíticas para todos os agrotóxicos são adequados para realizar determinações analíticas dos agrotóxicos na matriz de tecido hepático.

Vale ressaltar que ambos os métodos analíticos apresentaram boa linearidade para as duas matrizes estudadas e que a faixa de trabalho foi considerada suficiente para quantificar a presença dos resíduos dos agrotóxicos nos tecidos dos anuros.

4.3.3 Efeito matriz

Para avaliar a ocorrência do efeito matriz nos métodos analíticos desenvolvidos, as inclinações das curvas analíticas preparadas em solvente (MeOH) e na matriz (calibração na matriz) foram comparadas, conforme recomendado pelo documento SANTE/12682/2019 (SANTE, 2020). O indicativo qualitativo do efeito matriz em um método analítico é confirmado, segundo o documento, quando não há paralelismo entre as inclinações das duas curvas analíticas. Porém, quantitativamente o efeito matriz pode ser medido a partir da Equação 2, para cada agrotóxico estudado nas duas matrizes. Os valores obtidos estão apresentados na Figura 18.

Figura 18. Porcentagens do efeito matriz obtidas para cada agrotóxico empregando o método mini-QuEChERS para as amostras de tecidos (a) adiposo e (b) hepático.



Como pode ser observado na Figura 18, todos os agrotóxicos estudados, em ambas as matrizes, apresentam efeito matriz que variaram de -3,3 - 33,3 %. O efeito matriz pode ser considerado negligenciável quando é inferior a 20 % e considerado mediano quando encontrado na faixa de 20-50 % (ECONOMOU *et al.*, 2009).

Os efeitos obtidos podem ser positivos ou negativos e são causados por interferentes advindos da amostra que coeluem junto ao analito. Quando os efeitos obtidos são inferiores a 20 %, significa que a matriz apresenta uma baixa influência sobre as áreas dos picos dos analitos. Isto pode confirmar a seletividade do método cromatográfico, afirmando que não há a presença de possíveis interferentes com o mesmo tempo de retenção dos analitos, e confirmar a eficiência do método no preparo da amostra em isolar os analitos dos interferentes da matriz. Para a matriz do tecido hepático (Figura 18b), todos os compostos apresentaram baixo efeito matriz, exceto para o β -endossulfan, que apresentou valor ligeiramente superior a 20 %. Já para matriz do tecido adiposo, alguns compostos apresentaram valores superiores a 20 %, porém todos menores que 50 %, indicando um efeito matriz mediano do método (CHIARELLO *et al.*, 2017; ARIAS, 2019).

Quando se trabalha com matrizes mais gorduras e complexas, como os tecidos adiposo e hepático, as respostas podem apresentar efeito matriz devido à presença de carboidratos, proteínas e lipídeos, coextraídos no processo de extração que podem causar o efeito matriz (PINHO; SILVÉRIO, 2010). Porém, a maioria dos efeitos matrizes obtidos pode ser considerada baixa ou média e para todas as situações serão empregadas curvas analíticas preparadas na matriz para compensar esse efeito.

4.3.4 Limites de quantificação e de detecção

O limite de quantificação de um método analítico é uma importante figura de mérito, pois indica a menor concentração do analito em uma matriz que o método consegue quantificar com precisão e exatidão aceitáveis. Para contaminantes orgânicos como os agrotóxicos, que normalmente são encontrados em níveis menores que partes por milhão (ppm) nas amostras, é um parâmetro de fundamental importância que tenha o menor valor possível e, assim, o método analítico possua a maior detectabilidade possível. Para os dois métodos otimizados neste trabalho, os LOQ foram obtidos a partir da injeção sequencial de concentrações diluídas dos agrotóxicos nas matrizes até a obtenção da menor concentração repetitiva (medida em triplicata), com RSD < 20 %, de cada agrotóxico. Os resultados obtidos de LOQ dos agrotóxicos para os tecidos adiposo e hepático são apresentados na Tabela 9, assim como a sensibilidade e o limite de detecção (LOD) dos métodos para cada agrotóxico.

Tabela 9. Figuras de mérito obtidas para os métodos de determinação de agrotóxicos em amostras de tecido (A) adiposo e (B) hepático.

Agrotóxicos	(A) Sensibilidade (L mg ⁻¹)	(B) Sensibilidade (L mg ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	LOD (mg L ⁻¹)
Atrazina	0,3012	0,2144	0,010	0,003
α -Endossulfan	0,0083	-	0,070	0,023
β -Endossulfan	0,0105	0,0101	0,070	0,023
Clorpirifós	0,0323	0,0209	0,050	0,017
α -Cipermetrina	0,0153	0,0121	0,050	0,017
β -Cipermetrina	0,0222	0,0180	0,050	0,017
θ -Cipermetrina	0,0170	0,0138	0,050	0,017
ζ -Cipermetrina	0,0214	0,0190	0,050	0,017

O método apresentou maior detectabilidade para a atrazina em relação aos demais agrotóxicos estudados. Isto ocorre devido às diferentes absorvidades molares, uma vez que, a atrazina apresenta maior absorvidade molar que os demais compostos nos comprimentos de onda de absorção máxima de cada um (PUBCHEM, 2020). Já o endossulfan apresentou a menor detectabilidade para os métodos desenvolvidos. Vale ressaltar que os valores dos LOQ obtidos variaram de 0,01-0,07 mg L⁻¹, indicando que o método apresenta boa detectabilidade para quantificar os resíduos de agrotóxicos nas matrizes estudadas, considerando o uso da técnica HPLC-DAD.

Os valores de LOD apresentados na Tabela 9 foram estimados a partir dos valores de LOQ. O LOD é um parâmetro do método que pode ser usado de forma comparativa com outros métodos

desenvolvidos para a mesma finalidade, uma vez que esta concentração não apresenta confiabilidade adequada em níveis de precisão e exatidão (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

4.3.5 Precisão dos métodos

A precisão de um método pode ser determinada em três níveis distintos: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (SANTE, 2020). No presente trabalho, foram avaliadas a repetibilidade e a precisão intermediária dos métodos analíticos propostos.

4.3.5.1 Repetibilidade

A repetibilidade dos métodos desenvolvidos foi avaliada a partir da análise de amostras de tecidos adiposo e hepático fortificadas com padrões dos agrotóxicos em sextuplicata (6 repetições) cada, conforme recomendado pelo documento SANTE/12682/2019 (SANTE, 2020). Para esta medida, todas as condições de execução dos métodos foram mantidas constantes e inalteradas, mesmo analista, mesmo dia etc. As amostras de tecido hepático e de tecido adiposo foram fortificadas em duas concentrações, 3x LOQ e 10x LOQ, em sextuplicata cada, sendo a repetibilidade dos métodos avaliadas pelo desvio padrão relativo dos resultados das medidas (RSD). Os valores de RSD obtidos para as medidas realizadas no tecido adiposo estão apresentados na Tabela 10 e para as medidas realizadas no tecido hepático estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 10. Precisão, no nível de repetibilidade, do método de determinação de agrotóxicos em tecido adiposo baseado na extração mini-QuEChERS. (n = 6)

Agrotóxicos	Repetibilidade (%RSD)	
	3×LOQ	10×LOQ
Atrazina	5,9	2,7
α-Endossulfan	3,9	2,5
β-Endossulfan	1,7	0,6
Clorpirifós	15,7	2,7
α-Cipermetrina	8,9	1,9
β-Cipermetrina	3,1	1,7
θ-Cipermetrina	5,5	6,2
ζ-Cipermetrina	2,8	1,6
α, δ, θ, Cipermetrina	0,7	0,8

De acordo com os dados apresentados na Tabela 10, o RSD para os agrotóxicos extraídos da matriz de tecido adiposo empregando o método mini-QuEChERS otimizado variou na faixa de 0,6-15,7 % a partir de seis replicatas realizadas sob condições idênticas em um curto intervalo de tempo. Assim, considerando os critérios de aceitação do documento SANTE/12682/2019, o qual indica que a precisão de um método analítico é obtida quando a variação dos resultados de medidas idênticas apresenta um $RSD < 20 \%$, é possível concluir que o método proposto para a determinação de resíduos de agrotóxicos em tecido adiposo apresenta boa repetibilidade. Todos os RSD obtidos em ambas as concentrações avaliadas para os agrotóxicos estão abaixo do limite aceitável.

Tabela 11. Precisão, no nível de repetibilidade, do método de determinação de agrotóxicos em tecido hepático baseado na extração mini-QuEChERS. (n = 6)

Agrotóxicos	Repetibilidade (%RSD)	
	3×LOQ	10×LOQ
Atrazina	19,3	0,6
α-Endossulfan	0,4	0,8
β-Endossulfan	2,9	0,6
Clorpirifós	2,1	0,7
α-Cipermetrina	1,9	2,7
β-Cipermetrina	1,4	1,0
θ-Cipermetrina	3,1	1,8
ζ-Cipermetrina	3,3	2,5
α, δ, θ, Cipermetrina	19,3	0,6

De acordo com os dados da Tabela 11, os valores de RSD para as medidas de recuperação dos agrotóxicos da matriz de tecido hepático ficaram no intervalo de 0,4-19,3 %, demonstrando que o método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tecido hepático apresenta repetibilidade adequada, uma vez que todos os RSD estão abaixo do limite máximo recomendável pelo documento SANTE/12682/2019.

4.3.5.2 Precisão intermediária ou reprodutibilidade dentro do laboratório

A precisão intermediária dos métodos analíticos de determinação de agrotóxicos nos tecidos adiposo e hepático foi avaliada de acordo com o documento SANTE/12682/2019, realizando a extração via métodos mini-QuEChERS otimizados de amostras, em sextuplicata, dos

tecidos fortificadas em dois níveis de concentração dos agrotóxicos, 3x LOQ e 10x LOQ. Essas medidas foram realizadas de forma idêntica, mantendo as condições, porém em três dias diferentes e executadas por três analistas diferentes, totalizando 18 repetições para cada nível de concentração dos agrotóxicos. A precisão intermediária foi expressa na forma de desvio padrão relativo e os resultados obtidos para as amostras de tecido adiposo e tecido hepático podem ser analisados na Tabela 12 e na Tabela 13, respectivamente.

Tabela 12. Precisão, no nível de precisão intermediária, do método de determinação de agrotóxicos em tecido adiposo baseado na extração mini-QuEChERS. (n = 18)

Agrotóxicos	Precisão intermediária (%RSD)		Precisão total (%RSD)	
	3×LOQ	10×LOQ	3×LOQ	10×LOQ
Atrazina	3,5	5,6	4,3	5,7
α-Endossulfan	3,0	2,9	3,4	3,1
β-Endossulfan	2,9	0,7	3,0	0,8
Clorpirifós	9,4	5,2	11,1	5,3
α-Cipermetrina	8,7	6,6	9,5	6,7
β-Cipermetrina	3,4	2,9	3,6	3,0
θ-Cipermetrina	7,6	8,1	8,0	8,5
ζ-Cipermetrina	2,6	1,6	2,9	1,7
α, δ, θ, Cipermetrina	6,2	0,8	6,2	0,8

A precisão intermediária do método de determinação de agrotóxicos em tecido adiposo, conforme pode ser observado na Tabela 12, pode ser considerada adequada uma vez que os valores de RSD variaram de 0,7 a 9,4 %, de acordo com o tipo de agrotóxico e os seus níveis de fortificação na matriz. Portanto, os valores estão abaixo dos 20 %, considerando o limite para uma boa precisão do método analítico de acordo com o documento SANTE/12682/2019. A precisão total do método proposto para a determinação de agrotóxicos em tecido adiposo também foi calculada a partir da Equação 9 e apresentada na Tabela 12 para cada agrotóxico e em cada nível de concentração avaliado. Os resultados de RSD obtidos para a precisão total indicaram que apesar da ausência de uma etapa de limpeza e da complexidade da matriz estudada a extração mini-QuEChERS pode ser considerada precisa para a finalidade a que se propõe. Os valores de RSD ficaram na faixa de 0,8-11,1 %.

$$S_{total} = \sqrt{\left(\frac{s_{repet}^2}{n} + S_{PI}^2\right)} \quad \text{Equação 9}$$

Em que: S_{repet} = desvio padrão da repetibilidade; n = número de repetições para obtenção da S_{repet} ; S_{PI} = desvio padrão da precisão intermediária.

Tabela 13. Precisão, no nível de precisão intermediária, do método de determinação de agrotóxicos em tecido hepático baseado na extração mini-QuEChERS. (n = 18)

Agrotóxicos	Precisão intermediária (RSD)		Precisão total (RSD)	
	3×LOQ	10×LOQ	3×LOQ	10×LOQ
Atrazina	10,9	3,1	15,0	3,1
α-Endossulfan	4,9	2,4	4,9	2,4
β-Endossulfan	2,4	1,1	2,7	1,1
Clorpirifós	1,6	0,7	1,8	0,8
α-Cipermetrina	7,9	3,1	7,9	3,3
β-Cipermetrina	1,3	1,6	1,4	1,6
θ-Cipermetrina	4,0	1,9	4,2	2,0
ζ-Cipermetrina	3,6	2,1	3,9	2,3
α, δ, θ, Cipermetrina	10,9	3,1	15,0	3,1

De forma similar à matriz de tecido adiposo, os valores de RSD para os ensaios de precisão intermediária para o método desenvolvido para a determinação de agrotóxicos em tecido hepático ficaram dentro do valor indicado como de boa precisão pelo guia da Comunidade Europeia (SANTE, 2020). Os valores de RSD para a matriz de tecido hepático ficaram na faixa de 0,7 a 10,9 %, conforme observa-se na Tabela 13. A precisão total do método foi calculada pela Equação 9 e os resultados obtidos também indicaram que, apesar da complexidade das amostras, o método mini-QuEChERS para extração dos agrotóxicos das amostras de tecido hepático pode ser considerado preciso.

Outro fato que pode ser observado nas Tabelas 10 a 13 é que para a maioria dos agrotóxicos os desvios são maiores para níveis de fortificação menores dos agrotóxicos, de 3xLOQ. Isto ocorre devido à proximidade do nível fortificado com o LOQ do método, já que quanto mais próximo deste limite, maiores são as instabilidades nas linhas de base do cromatograma e, portanto, maior a variabilidade nas áreas de picos dos agrotóxicos e, consequentemente, maiores serão os valores de RSD.

4.3.6 Exatidão (ensaios de recuperação)

No presente trabalho, a exatidão do método proposto foi avaliada através de ensaios de recuperação, por ser o método de determinação da exatidão mais comumente empregado e devido a indisponibilidade de materiais de referência certificados para as amostras e os analitos e pela inexistência de métodos analíticos de mesma finalidade. Para obter a exatidão do método de

determinação de agrotóxicos no tecido adiposo e no tecido hepático, foram realizadas extrações em sextuplicata, em dois níveis de fortificação ($3\times\text{LOQ}$ e $10\times\text{LOQ}$), realizando as análises em três dias distintos executados por três analistas diferentes. As taxas de recuperação obtidas para os agrotóxicos nas duas matrizes foram calculadas de acordo com a Equação 6. A exatidão do método foi estimada a partir dos valores percentuais de recuperação dos agrotóxicos. Nas Tabelas 14 e 15 são apresentados os valores das recuperações para as matrizes de tecido adiposo e de tecido hepático, respectivamente.

Tabela 14. Porcentagens de recuperação obtidas em dois níveis de concentração e em três dias distintos para avaliar a exatidão do método de determinação de agrotóxicos em tecido adiposo.

Agrotóxicos	Taxa de recuperação (%)					
	1º dia		2º dia		3º dia	
	3xLOQ	10xLOQ	3xLOQ	10xLOQ	3xLOQ	10xLOQ
Atrazina	103,1	102,3	101,7	100,6	101,5	95,7
α -Endossulfan	96,8	85,2	95,5	87,0	96,1	84,5
β -Endossulfan	93,6	99,1	96,4	99,8	97,8	98,4
Clorpirifós	90,0	92,6	99,9	101,0	99,7	103,5
α -Cipermetrina	81,2	83,5	81,0	95,9	73,8	95,9
β -Cipermetrina	114,8	113,3	111,5	112,3	112,6	107,5
θ -Cipermetrina	99,0	109,0	92,5	92,3	91,7	99,5
ζ -Cipermetrina	98,2	102,3	99,1	100,9	97,9	104,0
α , δ , θ , Cipermetrina	108,7	99,7	100,2	98,9	95,6	99,1

Conforme expresso no guia de validação da comunidade europeia a porcentagem de recuperação de agrotóxicos em matrizes alimentícias deve estar em uma faixa de 70-120 % e, para algumas amostras mais complexas as variações podem se situar em uma faixa ainda mais extensa, de 30-140 % desde que os resultados apresentem precisão com $\text{RSD} \leq 20\%$. Através dos dados apresentados na Tabela 14, as porcentagens de recuperação dos agrotóxicos nas amostras de tecido adiposo empregando o método mini-QuEChERS otimizado se situaram entre 73,8-114,8 %, ou seja, dentro dos critérios de aceitação do documento SANTE/12682/2019. Portanto, os resultados se mostraram satisfatórios para os dois níveis de fortificação, nos três dias de análise, indicando que o método proposto tem boa exatidão de resposta para a determinação de resíduos de agrotóxicos em tecido adiposo.

Tabela 15. Porcentagens de recuperação obtidas em dois níveis de concentração e em três dias distintos para avaliar a exatidão do método de determinação de agrotóxicos em tecido hepático.

Agrotóxicos	Taxa de recuperação (%)					
	1º dia		2º dia		3º dia	
	3xLOQ	10xLOQ	3xLOQ	10xLOQ	3xLOQ	10xLOQ
Atrazina	108,0	99,1	99,8	101,8	98,5	100,8
β -Endossulfan	98,5	98,9	98,2	99,5	91,8	95,3
Clorpirifós	97,4	100,1	97,0	100,4	95,7	101,3
α -Cipermetrina	98,5	100,4	99,4	99,8	-	-
β -Cipermetrina	103,7	104,1	107,2	107,4	-	-
θ -Cipermetrina	98,1	98,1	99,3	96,7	-	-
ζ -Cipermetrina	97,5	100,1	99,0	100,8	100,7	102,3
α , δ , θ -Cipermetrina	97,4	104,6	94,9	106,1	95,2	106,8

Através dos dados apresentados na Tabela 15, as porcentagens de recuperação dos agrotóxicos das amostras de tecido hepático, empregando o método mini-QuEChERS, se situaram na faixa de 91,8-108,0 %. Portanto, os resultados obtidos estão dentro do critério de aceitação do documento SANTE/12682/2019 e se mostraram satisfatórios para os dois níveis de fortificação nos três dias de análise também para a matriz de tecido hepático. No terceiro dia de análise, os isômeros α -cipermetrina, β -Cipermetrina e θ -Cipermetrina coeluíram não sendo, portanto, possível a integração dos picos individualmente de forma confiável e, desta forma, foi considerada neste caso a soma das áreas dos picos, que se mostraram eficientes e com boa exatidão conforme indicado na Tabela 15.

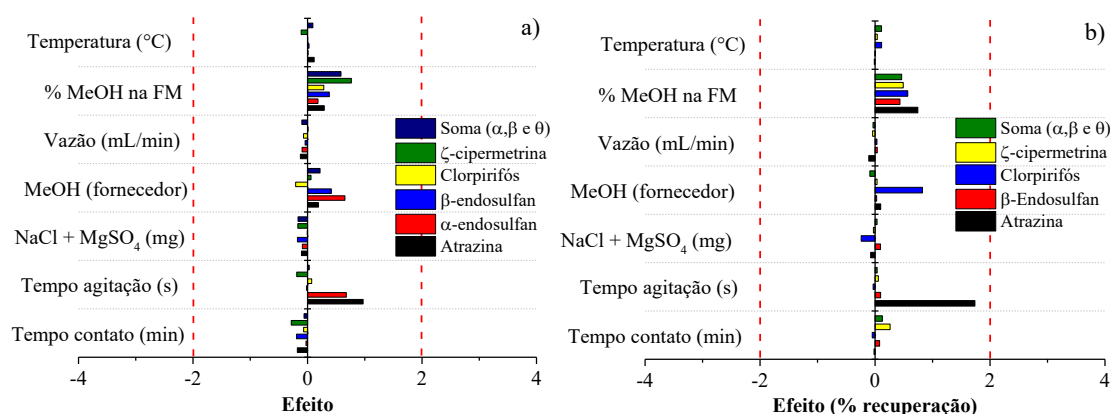
Sobre a exatidão dos métodos propostos é importante pontuar também que apesar das matrizes apresentarem características totalmente distintas entre si e os métodos mini-QuEChERS terem sido ajustados para promover as extrações dos agrotóxicos de forma eficiente, pode-se considerar que os objetivos foram alcançados. As taxas de recuperação ficaram na faixa de 73-114% com RSD < 20 % para todos os agrotóxicos, independentemente do nível de fortificação e do dia de realização das extrações, garantindo uma certa confiabilidade na aplicação do método.

4.3.7 Robustez (teste de Youden)

Para avaliar a robustez dos dois métodos desenvolvidos neste trabalho foi aplicado o teste de Youden (YOU DEN; STEINER, 1975). Neste teste são avaliados sete fatores, que podem sofrer variações em seus níveis durante as análises de rotina envolvendo os métodos a serem validados, em 8 experimentos, combinando os níveis e os fatores de forma que nenhum dos oito experimentos

sejam repetidos. A robustez do método analítico neste trabalho foi determinada a partir dos efeitos de cada fator estudados em dois níveis (método original e variação deliberada) sobre a porcentagem de recuperação do método para cada agrotóxico. Para ser considerado suficientemente robusto o método deveria apresentar uma variação da taxa de recuperação, calculada pelo efeito de cada fator como indicado na Equação 7, inferior a 2 %. Os resultados dos efeitos para cada um dos sete fatores avaliados obtidos para as duas matrizes estão apresentados na Figura 19.

Figura 19. Efeito dos fatores avaliados no estudo de robustez dos métodos de determinação de agrotóxicos em (a) tecido adiposo e (b) tecido hepático, empregando os respectivos métodos mini-QuEChERS propostos.



Analisando os gráficos da Figura 19, pode-se observar que, para cada fator avaliado (temperatura da coluna, % de metanol na fase móvel, vazão da fase móvel, marca de metanol, quantidade dos sais de partição, tempo de agitação da amostra com o solvente extrator e o tempo de contato dos padrões dos agrotóxicos com as matrizes) os valores de seus efeitos indicaram uma variação da taxa de recuperação inferior a 2 % nos testes de Youden em ambos os métodos. Estes resultados indicam que os métodos aqui desenvolvidos podem ser considerados robustos para a finalidade a que se propõem. O fator que causou maiores efeitos nas taxas de recuperação para os dois métodos foi a porcentagem de metanol na composição da fase móvel, cujas variações totais foram inferiores a 5 %, considerando a soma de todos os efeitos nas taxas de recuperação dos agrotóxicos. A taxa de recuperação que mais variou foi para a atrazina devido à mudança no tempo de agitação da amostra fortificada em contato com o solvente extrator, esse fato pode estar associado ao aumento no efeito matriz provocado pelas amostras de tecido hepático, causando maior extração de coextrativos para a fase da acetonitrila. No entanto, o valor do efeito foi inferior a 2 %, critério de aceitação para um método robusto.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que a separação e a identificação dos oito agrotóxicos, extraídos dos tecidos adiposo e hepático de frango, podem ser realizadas com êxito, incluindo a separação de isômeros da cipermetrina e do endossulfan. Os dois métodos de extração QuEChERS miniaturizados neste trabalho ofereceram extrações rápidas e eficientes dos agrotóxicos das matrizes de tecido adiposo e hepático com elevadas taxas de recuperação, boa precisão e de forma robusta.

Os métodos mini-QuEChERS otimizados neste trabalho consistiram em quantidades de amostra, sais de partição e de limpeza e solvente extrator reduzidos para se adequar às pequenas dimensões das amostras dos tecidos adiposos e hepáticos dos anuros: *Leptodactylus macrosternum* e *Scinax x-signatus*. Apesar das diferenças significativas entre os tipos de tecidos, os métodos desenvolvidos neste trabalho apresentaram diferenças em suas condições de operação que permitiram recuperações dos agrotóxicos sem efeito matriz significativo e com limites de quantificação entre 10 e 70 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os oito agrotóxicos testados, que permitirá quantificá-los nas amostras de tecidos de anuros coletadas na Região do Baixo Jaguaribe, Ceará.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR JÚNIOR, C. A. S. Determinação de carbendazim em suco de laranja, empregando extração na ponteira descartável de micropipeta com sorvente preparado em laboratório. 2019. 69 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba, 2019. DOI: <https://doi.org/10.14393/ufu.di.2019.364>.
- AMNH – American Museum of Natural History. Amphibian Species of the world. Disponível em: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/>. Acesso em: 22 dez. 2020.
- ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J. STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, v. 86, p. 412-431, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>.
- ARAÚJO, E. A.; LARA, M. C. R.; REIS, M. R.; VIRIATO, R. L. S.; ROCHA, R. A. R.; GONÇALVES, R. G. L.; HELENO, F. F.; QUEIROZ, M. E. L. R.; TRONTO, J.; PINTO, F. G. Determination of haloxyfop-methyl, linuron, and procymidone pesticides in carrot using SLE-LTP extraction and GC-MS. *Food Analytical Methods*, v. 9, p. 1344-1352, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0315-3>.
- ARIAS, J. L. O. Determinação de conservantes em alimentos processados empregando QuEChERS, SILLME e HPLC-UV: estudo de métodos e estimativa da ingestão diária. 2019. 166 f. Tese (Doutorado em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande. Disponível em: <http://repositorio.furg.br/handle/1/8312>.
- BANDEIRA, D. D.; MUNARETTO, J. S.; RIZETTI, T. M.; FERRONATO, G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R.; ADAIME, M. B. Determinação de resíduos de agrotóxicos em leite bovino empregando QuEChERS modificado e GC-MS/MS. *Química Nova*, v. 37, p. 900-907, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140145>.
- BARROS NETO; B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, E. R. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 4ª ed. Rio de Janeiro: Bookman, 2010.
- BOARETTO, A. E. A evolução da população mundial, da oferta de alimentos e das ciências agrárias. *Ceres*, v. 56, p. 513-526, 2009.
- BORSOI, A.; SANTOS, P. R. R.; TAFFAREL, L. E.; GONÇALVES JÚNIOR, A. C. Agrotóxicos: histórico, atualidades e meio ambiente. *Acta Iguazu*, v. 3, p. 86-100, 2014. DOI: <https://doi.org/10.48075/actaiguaz.v3i1.9650>.
- BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A química dos agrotóxicos. *Química Nova na Escola*, v. 34, p. 10-15, 2012.
- BRASIL, Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/1992/prt0003_16_01_1992.html. Acesso em: 21 dez. 2020.
- CABRERA, L. D. C.; MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; PRESTES O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. *Scientia Chromatographica*, v. 4, p. 227-240, 2012. DOI: <https://doi.org/10.4322/sc.2012.013>.

CALDAS, S. S.; BOLZAN, C. M.; MENEZES, E. J.; ESCARRONE, A.; MARTINS, C.; BIANCHINI, A.; PRIMEL, E. G. A vortex-assisted MSPD method for the extraction of pesticide residues from fish liver and crab hepatopancreas with determination by GC-MS. *Talanta*, v. 112, p. 63-68, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.054>.

CAMPANHOLA, C.; RODRIGUES, G. S.; BETTIOL, W. Evolução, situação atual, projeção e perspectiva de sucesso de um programa de racionalização do uso de agrotóxicos no Brasil. In: RODRIGUES G. S. *Racionalización del uso de pesticidas en el Cono Sur*. Montevideu: Procisur; 1998. p. 43-49.

CARVALHO, G. O. Preparação e caracterização de fase estacionária baseada na imobilização micro-ondas do poli(dimetil-co-alquilmetilsiloxano) sobre sílica para CLAE-FR. 2014. 64 f. Monografia de Conclusão (Graduação em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba, 2014.

CASSAL, V. B.; AZEVEDO, L. F.; FERREIRA, R. P.; SILVA, D. G.; SIMÃO, R. S. Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Digital*, v. 18, p. 437-445, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5902/2236117012498>.

CHIARELLO, M.; GRAEFF, R. N.; MINETTO, L.; CEMIN, G.; SCHNEIDER, V. E.; MOURA, S. Determinação de agrotóxicos na água e sedimentos por hplc-hrms e sua relação com o uso e ocupação do solo. *Química Nova*, v. 40, p. 158-165, 2017. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20160180>.

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

EDWARDS, C. Environmental pollution by pesticides. Berlin: Springer-Verlag, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8942-6>.

FANG, G.; LAU, H. F.; LAW, W. S.; LI, S. F. Y. Systematic optimisation of coupled microwave-assisted extraction-solid phase extraction for the determination of pesticides in infant milk formula via LC-MS/MS. *Food Chemistry*, v. 134, p. 2473-2480, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.076>.

FREITAS, C. M. B.; BOMBARDI, M. L. A política nacional de irrigação e o uso de agrotóxicos no Brasil: contaminação e intoxicações no Ceará. *GEOgraphia*, v. 20, p. 86-100, 2018. DOI: <https://doi.org/10.22409/GEOgraphia2018.v20i43.a27213>.

GENDRON, A. D.; MARCOGLIESE, D. J.; BARBEAU, S.; CHRISTIN, M. S.; BROUSSEAU, P.; RUBY, S.; CYR, D.; FOURNIER, M. Exposure of leopard frogs to a pesticide mixture affects life history characteristics of the lungworm *Rhabdias ranae*. *Oecologia*, v. 135, p. 469-476, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00442-003-1210-y>.

GONDIM, S. R.; TEIXEIRA, S. A.; ROSA, F. M.; FIGUEIREDO, B. C. M.; PEREIRA, M. P.; COSTA, G. A. C.; SABINO, V. K. Diagnóstico da agricultura irrigada no Baixo e Médio Jaguaribe. *Revista Econômica do Nordeste*, v. 35, p. 424-430, 2004.

HERCEGOVÁ, A.; DOMOTOROVÁ, M.; MATISOVÁ, E. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination.

Journal of Chromatography A, v. 1153, p. 54-73, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.008>.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Portaria normativa nº 84, de 15 de outubro de 1996. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/component/legislacao/?view=legislacao&force=1&legislacao=99498>. Acesso em: 21 dez. 2020.

JOFRE, M. B.; ANTÓN, R. I.; CAVIEDES-VIDAL, E. Organochlorine contamination in anuran amphibians of an artificial lake in the semiarid midwest of Argentina. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 55, p. 471-480, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9122-1>.

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

KWON, J. W. Harmonization of MRL setting for compounds used both as pesticides and as veterinary drugs with regulatory aspects - cypermethrin in food of animal origin. *Korean Journal of Environmental Agriculture*, v. 30, p. 89-97, 2011. DOI: <https://doi.org/10.5338/KJEA.2011.30.1.89>.

MANN, R. M.; HYNE, R. V.; CHOUNG, C. B.; WILSON, S. P. Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution*, v. 157, p. 2903-2927, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.015>.

MILHOME, L. A. M.; SOUSA, B. O. D.; LIMA, F. A. F.; NASCIMENTO, F. R. Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE. *Engenharia Sanitária Ambiental*, v. 14, p. 363-372, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-41522009000300010>.

MÔNICO, A. T.; CLEMENTE-CARVALHO, R. B. C.; LOPES, S. R.; PELOSO, P. L. V. Anfíbios anuros de brejos e lagoas de São Roque do Canaã, Espírito Santo, Sudeste do Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia*, v. 57, p. 197-206, 2017. DOI: <https://doi.org/10.11606/0031-1049.2017.57.16>.

MORAIS, E. H. D. C.; RODRIGUES, A. A. Z.; QUEIROZ, M. E. L. R.; 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.024>.

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

OERKE, E. C. Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, v. 144, p. 31-43, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. Rio de Janeiro: SciELO Books, p. 21-41, 2003.

PINHO, G. P.; SILVÉRIO, F. O. Influência dos constituintes químicos dos extratos de diferentes matrizes na resposta cromatográfica de agrotóxicos. *Química Nova*, v. 33, p. 909-913, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000400028>.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. *Scientia Chromatographica*, v. 3, p. 51-64, 2011. DOI: <https://doi.org/10.4322/sc.2011.004>.

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. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000600046>.

PUBCHEM, Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em 03 out. 2020.

REBELO, R. M.; CALDAS, E. D. Avaliação de risco ambiental de ambientes aquáticos afetados pelo uso de agrotóxicos. *Química Nova*, v. 37, p. 1199-1208, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140165>.

RELYEA, R. A.; SCHOEPPNER, N. M.; HOVERMAN, J. T. Pesticides and amphibians: the importance of community context. *Ecological Applications*, v. 15, p. 1125-1134, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1890/04-0559>.

RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. *Liberato*, v. 10, p. 148-158, 2009. DOI: <https://doi.org/10.31514/rliberato.2009v10n14.p149>.

RIDGWAY, K.; LALLJIE, S. P. D.; SMITH, R. M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *Journal of Chromatography A*, v. 1153, p. 36-53, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.134>.

SANTANA, J. D.; MÂNGIA, S.; FILHO, S. R. R.; BARROS, S. C. L.; ANDRADE, I.; NAPOLI, F. M.; JUNCÁ, F.; GARDA, A. A. Anurans from the Middle Jaguaribe River Region, Ceará state, Northeastern Brazil. *Biota Neotropica*, v. 3, p. 1-8, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/1676-06032015001715>.

SANTE, European Commission. 2020. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, SANTE/12682/2019, implemented by 01/01/2020. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2019-12682.pdf. Acesso em: 12 set. 2020.

SILVA, L. R. D.; FERREIRA, M. M. C. Estudo do coeficiente de partição octanol-água de bifenilas policloradas (PCBs) utilizando parâmetros topológicos. *Química Nova*, v. 26, p. 312-318, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000300005>.

SOARES, R.; SILVA, S.; SOUZA FILHO, F.; STUDART, T.; FROTA, R. Groundwater vulnerability to agrochemical contamination. *Brazilian Journal of Environmental Sciences*, v. 55, p. 440-455, 2020. DOI: <https://doi.org/10.5327/Z2176-947820200531>.

SOARES, C. E. S.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; OLIVEIRA, A. F.; COSTA, A. I. G.; ASSIS, R. C.; ANDRADE, C. E. O. Determination of pesticides in soil using a hyphenated

extraction technique. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 26, p. 1790-1797, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150155>.

SPARLING, D. W.; FELLERS, G. M. Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 28, p. 1696-1703, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1897/08-336.1>.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for singlelaboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Applied Chemistry*, v. 74, p. 835-855, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1351/pac200274050835>.

TOLEDO, L. F.; SILVA, S. P. C.; SÁNCHEZ, C.; ALMEIDA, M. A.; HADDAD, C. F. B. A revisão do Código Florestal Brasileiro: impactos negativos para a conservação dos anfíbios. *Biota Neotropica*, v. 10, p. 35-38, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1676-06032010000400003>.

VASCONCELOS, T. S.; ROSSA-FERES, D. C. Diversidade, distribuição espacial e temporal de anfíbios anuros (*Amphibia, anura*) na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica*, v. 5, p. 1-14, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1676-06032005000300010>.

VEIGA, M. M. Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça socioambiental. *Ciência e Saúde Coletiva*, v. 12, p. 145-152, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-81232007000100017>.

WHO, World Health Organization – Codex Alimentarius International Food Standards. 2017. Guidelines on performance criteria for methods of analysis for the determination of pesticide residues in food and feed (CXG 90-2017). Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/en/>. Acesso em 23 set. 2020.

WOEHL JÚNIOR, G.; WOEHL, E. N. Anfíbios da mata atlântica. Jaraguá do Sul: Instituto Rã-bugio para Conservação da Biodiversidade, 2008. Disponível em: http://www.ra-bugio.org.br/downloads/cartilha_anfibios.pdf. Acesso em: 21 dez. 2020.

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