



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



MARCELO DE OLIVEIRA FERREIRA

**OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO
COM PARTIÇÃO À BAIXA TEMPERATURA DE RESÍDUOS DE
AGROTÓXICOS EM POLPA DE PEQUI**

ITUIUTABA / MG

2019

MARCELO DE OLIVEIRA FERREIRA

**OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM
PARTIÇÃO À BAIXA TEMPERATURA DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM
POLPA DE PEQUI**

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

Orientador: Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria

ITUIUTABA / MG

2019

MARCELO DE OLIVEIRA FERREIRA

**OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM
PARTIÇÃO À BAIXA TEMPERATURA DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM
POLPA DE PEQUI**

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

13 de dezembro de 2019

Banca examinadora:

Prof. Dra. Regina Massako Takeuchi

Prof. Dr. Gilberto Augusto de Oliveira Brito

Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha esposa Elizandra, que teve toda paciência e carinho, e grande apoio durante toda essa etapa da minha formação.

Aos meus pais, que sempre me incentivaram, mesmo que à distância, a seguir em frente e buscar meus objetivos. Por terem me formado a pessoa que sou, e sem eles isso tudo não seria possível.

À minha tia Elane, que sempre me incentivou nos estudos, me apoiou em minhas decisões e esteve sempre à disposição para tudo que eu precisasse.

Ao professor orientador Dr. Anizio Marcio de Faria, por ter me aceitado como orientando, pela sua paciência pelos imprevistos que impediram que eu concluísse este trabalho mais cedo, pela sua orientação assertiva e centrada, e todos conhecimentos compartilhados e ajuda que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

Ao Allyson, por toda ajuda para com a operação do HPLC.

A todos professores do curso da química, que contribuíram para que eu chegasse até aqui e executar este trabalho, serão eternas fontes de inspiração profissional.

Agradeço aos amigos que fiz na Universidade, ao Rodolfo, Matheus, Priscilla, Ricardo, e tantos outros, cada um deixou seu marco.

E a Deus, meu muito obrigado por permitir que tudo isso fosse possível.

RESUMO

A elevada carga de agrotóxicos empregada nas monoculturas de grãos e de cana-de-açúcar no Cerrado brasileiro, em especial através da pulverização foliar, tem colocado em risco de contaminação uma ampla faixa de extensão territorial. Dentre dessa, árvores frutíferas nativas do Cerrado e que vêm sendo descobertas pelo brasileiro podem estar recebendo resíduos de agrotóxicos de forma indireta. Portanto, o monitoramento de agrotóxicos nas espécies mais consumidas pelo povo local se faz necessário, a fim de garantir a segurança alimentar. Esse trabalho buscou desenvolver um método para determinar resíduos de seis agrotóxicos, empregados nas monoculturas da região, na polpa do pequi, fruto mais identitário da região do Cerrado brasileiro. Para isso, o trabalho descreve o desenvolvimento e a otimização da extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) de resíduos dos agrotóxicos carboxina, carbendazim, clorpirifós, diuron, terbutilazina e tiabendazol da polpa do pequi, com análise dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos (UV-VIS). A otimização do método ESL-PBT foi realizada por planejamentos experimentais, sendo avaliados 8 fatores em 2 níveis que afetam a recuperação dos agrotóxicos da polpa de pequi. Os fatores otimizados foram: solvente extrator - acetato de etila; volume de solvente - 7,2 mL; massa da amostra - 0,5000 g; agitação Vórtex; volume de água - 3,4 mL; tempo de congelamento - 3 h; tempo de contato dos agrotóxicos e a polpa - 15 min, e; ausência de centrifugação na etapa de partição. As condições otimizadas resultaram em extrações dos agrotóxicos na faixa de 71,0 -103,7 %. O método de análise dos agrotóxicos foi relativamente rápido, com um tempo total de 12 min. A validação do método foi realizada a partir da avaliação de alguns parâmetros analíticos do método. Na validação foi observada uma boa linearidade de resposta do método em uma ampla faixa de concentração dos agrotóxicos. O método apresentou limites de quantificação, 0,008 a 0,500 mg L⁻¹, abaixo de outros métodos desenvolvidos para determinação dos agrotóxicos estudados em matrizes alimentícias. A eficácia do método ESL-PBT para extração dos resíduos de agrotóxicos da polpa de pequi foi confirmada pelas altas taxas de recuperação dos agrotóxicos e do extrato límpido e livre de interferências (baixo efeito matriz) obtidos no trabalho. Desta forma, foi possível desenvolver e otimizar o método ESL-PBT de resíduos de agrotóxicos da polpa de pequi, disponibilizando uma ferramenta analítica para monitoramento de resíduos nesse fruto, inexistente atualmente na literatura.

Palavras-chave: Agrotóxicos, Pequi, CLAE-DAD, ESL-PBT, otimização, planejamento experimental.

ABSTRACT

The high load of pesticides employed in grain and sugarcane crops in the Brazilian Cerrado, especially through leaf spraying, has put at risk of contamination a wide range of territorial extension. Among these, native fruit trees from the Cerrado, which have been recently discovered by Brazilians, may be receiving pesticide residues indirectly. Therefore, the monitoring of pesticides in fruits most consumed by local people is necessary to ensure food security. This work aimed to develop a method to determine residues of six pesticides in the Pequi pulp, the most identity fruit of the Brazilian Cerrado region. For this, the work describes the development and optimization of solid-liquid extraction with low-temperature partitioning (SLE-LTP) residues of the pesticide carboxin, carbendazim, chlorpyrifos, diuron, terbuthylazine and thiabendazole of Pequi pulp, with analysis of extracts by high-performance liquid chromatography with a diode array detector (UV-VIS). The optimization of the SLE-LTP method was performed by experimental design, and eight factors at different levels that affect the pesticide recovery from Pequi pulp were evaluated. The optimized factors were extractor solvent - ethyl acetate; solvent volume - 7.2 mL; sample mass - 0.5000 g; type of agitation - Vortex; water volume - 3.4 mL; freezing time - 3 h; contact time - 15 min; and absence of centrifugation in the partitioning step. The optimized conditions resulted in the extraction of pesticides from Pequi pulp in the range of 71.0-103.7 %. The method of analysis of pesticides was relatively fast, with a total time of 12 min of analysis. The validation of the method was performed from the evaluation of some analytical parameters of the method. Validation showed a good linearity of response of the method over a wide range of pesticide concentrations. The method presented quantification limits, 0.008 to 0.500 mg L⁻¹, below other methods developed to determine the pesticides studied in food matrices. The effectiveness of the SLE-LTP method for extracting pesticide residues from Pequi pulp was confirmed by the high recovery rates of pesticides and the clear and interference-free extract (low matrix effect) obtained in the work. In this way, it was possible to develop and optimize the SLE-LTP method for the extraction of pesticide residues in Pequi pulp, providing an analytical tool for the monitoring of pesticide residues in this fruit, which is not currently available in the literature.

Keywords: Pesticides, Pequi, HPLC-DAD, SLE-LTP, optimization, experimental design.

LISTA DE FIGURAS

<i>FIGURA 1 – O PEQUIZEIRO E SEUS FRUTOS, O PEQUI.</i>	11
<i>FIGURA 2 – PULVERIZAÇÃO DE AGROTÓXICOS – MANUAL X AÉREA.</i>	15
FIGURA 3 – ESQUEMA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA.	20
<i>FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO EM UM SISTEMA DE COORDENADAS DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS EM UM PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL PARA DOIS FATORES. (●) PLANEJAMENTO FATORIAL, (■) PONTO CENTRAL E (△) PLANEJAMENTO AXIAL.</i>	24
FIGURA 5 – CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DA MISTURA DE AGROTÓXICOS A 5 MG L ⁻¹ DESENVOLVIDA NESTE TRABALHO PARA ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO EM EXTRATOS DE POLPA DE PEQUI. CONDIÇÕES DE FASE MÓVEL VIDE TABELA 9. DETECÇÃO DAD A (A) 230 NM (COM COMPOSIÇÃO DE METANOL NA FM – LINHA VERMELHA), (B) 254 NM E (C) 285 NM.	34
FIGURA 6 - CROMATOGRAMA 3D DA SEPARAÇÃO DOS AGROTÓXICOS EMPREGADOS NO PEQUI NA FAIXA DE 200-310 NM. CONDIÇÕES DE FASE MÓVEL VIDE TABELA 9.	35
FIGURA 7 – RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DOS AGROTÓXICOS COM A ABSORBÂNCIA OBTIDA NOS COMPRIMENTOS DE ONDA DE 230, 254 E 285 NM E AJUSTES LINEARES. (A) CARBENDAZIM, (B) TIABENDAZOL, (C) CARBOXINA, (D) DIURON (E) TERBUTILAZINA E (F) CLORPIRIFÓS.	36
FIGURA 8 – GRÁFICO DE PARETO PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2 ⁸⁻⁴ DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA COM PARTIÇÃO A BAIXA TEMPERATURA DE AGROTÓXICOS DE POLPA DE PEQUI.	39
FIGURA 9 – EXTRATO DA POLPA DE PEQUI TÍPICO OBTIDO A PARTIR DA ESL-PBT DE AGROTÓXICOS EMPREGANDO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO.	40
FIGURA 10 – METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTAS PARA A ESL-PBT DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM POLPA DE PEQUI DE ACORDO COM O PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL.	44
FIGURA 11 – CURVAS ANALÍTICAS PARA OS AGROTÓXICOS ESTUDADOS.	47
FIGURA 12 – PORCENTAGEM DO EFEITO MATRIZ NA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS DA POLPA DE PEQUI, PELO MÉTODO ESL-PBT.	49

LISTA DE TABELAS

<i>TABELA 1 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA POLPA DO PEQUI ($G\ 100\ G^{-1}$).</i>	12
<i>TABELA 2 – CLASSIFICAÇÃO DOS AGROTÓXICOS PELA SUA TOXICIDADE.</i>	14
<i>TABELA 3 – AGROTÓXICOS ESCOLHIDOS PARA ESTUDO.</i>	16
<i>TABELA 4 – LMR ($MG\ KG^{-1}$) E IDA ($MG\ KG^{-1}\ M.C.$) DOS AGROTÓXICOS ESTUDADOS PARA ALGUMAS CULTURAS AGRÍCOLAS CULTIVADAS EM ÁREAS DO CERRADO BRASILEIRO.</i>	17
<i>TABELA 5 - MATRIZ DE EXPERIMENTOS PARA UM PLANEJAMENTO FATORIAL 2^2.</i>	23
<i>TABELA 6 – FATORES E NÍVEIS ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO PARA A ESL-PBT DE AGROTÓXICOS EM POLPA DE PEQUI.</i>	29
<i>TABELA 7 – PFF PARA AVALIAÇÃO DOS FATORES QUE AFETAM AS RESPOSTAS DE FORMA SIGNIFICATIVA NA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS DE POLPA DE PEQUI. FATORES E = $A \times B \times C$, F = $B \times C \times D$, G = $A \times B \times C \times D$, H = $A \times C \times D$.</i>	29
<i>TABELA 8 – MATRIZ DE EXPERIMENTOS PARA O PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL VISANDO A OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO ESL-PBT DE AGROTÓXICOS EM POLPA DE PEQUI. VARIÁVEIS: VOLUME DE ÁGUA E DE SOLVENTE EXTRATOR.</i>	31
<i>TABELA 9 – GRADIENTE DE SEPARAÇÃO DOS AGROTÓXICOS A SEREM DETERMINADOS EM POLPA DE PEQUI POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIÓDOS (UV-VIS).</i>	33
<i>TABELA 10 – COMPRIMENTOS DE ONDA (λ) DE MÁXIMA ABSORÇÃO DOS AGROTÓXICOS ANALISADOS.</i>	35
<i>TABELA 11 – RECUPERAÇÕES (%) DOS AGROTÓXICOS DA POLPA DE PEQUI A PARTIR DA EXTRAÇÃO ESL-PBT RESULTANTES DO PFF COM OS DESVIOS PADRÃO DE 3 MEDIDAS. ...</i>	38
<i>TABELA 12 – PORCENTAGENS DE RECUPERAÇÃO DOS AGROTÓXICOS EXTRAÍDOS DA POLPA DE PEQUI PELO MÉTODO ESL-PBT DE ACORDO COM OS EXPERIMENTOS DO PCC.</i>	42
<i>TABELA 13 – PORCENTAGENS DE RECUPERAÇÃO MÉDIA DOS AGROTÓXICOS OBTIDOS PELA ESL-PBT DE POLPA DE PEQUI DE ACORDO COM OS EXPERIMENTOS DO PCC. NÍVEIS VIDE TABELA 8.</i>	43
<i>TABELA 14 – FATORES E NÍVEIS OTIMIZADOS NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO À BAIXA TEMPERATURA DE AGROTÓXICOS EM POLPA DE PEQUI.</i>	46

TABELA 15 – EQUAÇÕES DE RETAS E COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO LINEARES DAS CURVAS ANALÍTICAS PARA OS AGROTÓXICOS ESTUDADOS PREPARADOS EM SOLVENTE E NO EXTRATO DA POLPA DE PEQUI.....	48
TABELA 16 – PARÂMETROS ANALÍTICOS DA METODOLOGIA DE DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM POLPA DE PEQUI.....	50
TABELA 17 – COMPARAÇÃO DOS LOQ (MG L^{-1}) NESSE TRABALHO COM OS ENCONTRADOS NA LITERATURA, E LMR (MG KG^{-1}) DEFINIDOS PELA ANVISA.....	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector de Arranjo de Diodos (UV-VIS)
ESL	Extração sólido-líquido
ESL-PBT	Extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
IDA	Ingestão Diária Aceitável
LD	Dosagem Letal
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LOQ	Limite de Quantificação
MSR	Metodologia de Superfícies de Resposta
PARA	Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PBT	Partição em baixa temperatura
PCC	Planejamento Composto Central
PFC	Planejamento Fatorial Completo
PFF	Planejamento Fatorial Fracionário
T _r	Tempo de Retenção

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 AGROTÓXICOS.....	13
1.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS.....	18
1.3 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	20
1.4 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS	21
2 OBJETIVOS.....	26
3 METODOLOGIA	27
3.1 REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAIS	27
3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE AGROTÓXICOS.....	27
3.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE AGROTÓXICOS POR CLAE-DAD	28
3.4 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO ESL-PBT DE AGROTÓXICOS DE POLPA DE PEQUI.....	28
3.4 VALIDAÇÃO DE ALGUNS PARÂMETROS ANALÍTICOS DO MÉTODO	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ANÁLISE DOS RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS POR CLAE-DAD	33
4.2 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO ESL-PBT	37
4.2.1 Seleção de fatores (Planejamento Fatorial Fracionário).....	37
4.2.2 Otimização da ESL-PBT de agrotóxicos da polpa de pequi (Planejamento Composto Central)	41
4.3 VALIDAÇÃO DE ALGUNS PARÂMETROS ANALÍTICOS DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA ..	46
5 CONCLUSÃO	53
6 PRÓXIMAS ETAPAS	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1 INTRODUÇÃO

Com área superada apenas pela Amazônia brasileira, o Cerrado se encontra em segundo lugar em termos de área e bioma brasileiro, e ocupa cerca de 21 % de todo território nacional. Seu clima é sazonal, sendo que a temporada de chuvas ocorre de outubro a março, seguido por uma estiagem de abril a setembro (KLINK; MACHADO, 2005).

O Cerrado brasileiro possui uma flora com uma grande diversidade de espécies frutíferas. O pequi, *Caryocar brasiliense* Camb., é uma destas espécies, que como as demais, possui alto potencial de exploração, tanto para a área da saúde quanto para a alimentícia (ALVES, *et al.*, 2014), além de ocorrer também a exploração da madeira para as construções rurais e fabricação de móveis (ANJOS; CHANCHAR; AKIMOTO, 2002). Por este motivo, o interesse humano pela espécie pode gerar uma exploração não sustentável, que ameaça a sua preservação (ALVES, *et al.*, 2014).

Considerada por alguns como árvore símbolo do cerrado, espécies do pequi, ocorrem em todas as regiões do Brasil, e também nas savanas, que possuem vegetações semelhantes às do cerrado brasileiro, da Costa Rica até o Paraguai. Como é uma espécie comum nestas áreas, o pequi, Figura 1, fruto proveniente do pequi, se torna um alimento indispensável na alimentação das comunidades que vivem nas áreas em que ocorrem essa árvore frutífera (OLIVEIRA, *et al.*, 2009).

Figura 1 – O pequi e seus frutos, o Pequi.



Fonte: Busca Google/imagens: pequi, frutos do pequi, pequi espinhos.

O pequi possui 4 estruturas principais, o exocarpo externo de cor marrom-esverdeada, os mesocarpos externo e interno, sendo o interno a parte comestível da fruta, de cor amarelo-claro a alaranjado escuro, e o externo, formado por uma polpa branca. A proteção da semente, que também é comestível, é o endocarpo interno, coberto por espinhos, e com coloração marrom (ALVES, *et al.*, 2014).

O pequizeiro atinge em média de 6 a 8 metros de altura. De agosto a novembro, o pequizeiro floresce e suas flores possuem em média de 5,0 a 7,5 cm de diâmetro, com variação de cores de esverdeada a branca, e são polinizadas principalmente por morcegos nectarívoros. Os pequis amadurecem de 3 a 4 meses após a polinização e cada árvore gera em média de 500 a 2000 frutos por safra. Os frutos possuem dimensões que variam de 4 a 7 cm de altura e 6 a 8 cm de diâmetro, e possui massa média de 100 a 220 g (RAMOS; SOUZA, 2011).

A colheita do pequi é predominantemente extrativista e representa fonte de renda e emprego para diversas famílias na época da safra, sendo que até 57 % da renda dos trabalhadores rurais do cerrado vem da comercialização de frutos provenientes da sua região. Sua produção é destinada para alimentação, para fabricação de cosméticos e também para a extração de óleos, e por possuir importante valor econômico, é conhecido como o ouro do cerrado (SANTOS, *et al.*, 2013).

A polpa do pequi é rica em compostos e nutrientes essenciais para uma boa alimentação. Possui altos teores de fibras alimentares e lipídeos, além de possuir mais compostos fenólicos e carotenoides que grande parte dos frutos brasileiros (CORDEIRO, *et al.*, 2013). A Tabela 1 mostra a composição centesimal da polpa do pequi de um estudo feito em 3 estados brasileiros.

Tabela 1 – Composição centesimal da polpa do pequi (g 100 g⁻¹).

Característica	TO	GO	MG
Umidade	72,17	56,21	54,78
Proteínas	4,09	3,73	3,73
Lipídeos	8,39	24,27	26,15
Cinzas	0,85	0,63	0,67
Carboidratos totais	14,5	15,16	14,67
Valor energético (kcal/100g)	149,87	293,99	308,95

Fonte: (ALVES, et al., 2014).

A variação da composição do pequi nos estados estudados foi baixa, com exceção do estado de Tocantins, que apresentou divergências de umidade, lipídeos e valor energético quanto aos outros estados. O autor enfatizou que os resultados de seus estudos são compatíveis

com a literatura. O teor elevado de lipídeos do pequi constitui grande parte da sua fonte energética, e além disso, o perfil de ácidos graxos é favorável à saúde, com composição de cerca de 60 % de ácidos graxos insaturados, sendo o ácido oleico predominante (ALVES, *et al.*, 2014).

Como toda cultura, o pequizeiro pode sofrer com algumas doenças, como por exemplo os fungos *Lasiodiplodia theobromae* e *Phomopsis sp.*, que causam a podridão dos frutos; os fungos *Colletotrichum acutatum*, causadores da antracnose (ANJOS; CHANCHAR; AKIMOTO, 2002); os fungos *Cylindrocladium clavatum*, que apodrecem as raízes das mudas; os fungos *Cerotelium giacomettii* e *Phomopsis sp.*, que causam o mal do cipó, e; os fungos *Botryodiplodia theobromae*, que podem causar a morte de pequizeiros em fase adulta. Estas doenças, podem reduzir a qualidade dos frutos e a produtividade do pequizeiro, e consequentemente, afetar a renda daquelas famílias que dependem desta cultura para seu sustento (SANTOS, *et al.*, 2013).

1.1 Agrotóxicos

Há registros que, desde a antiguidade, o homem utiliza substâncias químicas para o controle ou eliminação das pragas que afetam suas culturas agrícolas, também com o intuito de aumentar a produtividade da colheita e reduzir seus custos (ALVES FILHO, 2002). Essas substâncias químicas possuem diversas denominações: agrotóxicos, defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas, remédios de planta ou veneno, e todas remetem à mesma classe de substâncias químicas. São usados em plantações, florestas nativas, em ambientes urbanos, industriais e rurais, e podem até ser utilizados no combate de vetores de doenças. Existem mais de 1000 diferentes tipos de agrotóxicos, sendo eles usados como agentes inseticidas, herbicidas, fungicidas, nematicidas, fumigantes, e outros compostos orgânicos, e suas formulações são determinadas pelos princípios ativos, que corresponderão à sua atividade biológica (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

No Brasil, a bancada ruralista do Congresso Nacional tem empregado uma política em prol do licenciamento dos agrotóxicos (SOARES; PORTO, 2012), e sua crescente utilização tem causado uma série de impactos ambientais, como a contaminação dos seres vivos e sua retenção na água, ar, solo, biota, entre outros. A aplicação arbitrária e descontrolada de agrotóxicos pode causar efeitos agudos e crônicos aos seres vivos, e o nível tóxico, dose, tipo de contato da substância com o organismo e do tipo do organismo irá definir a magnitude da contaminação e os efeitos no ambiente (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

Os agrotóxicos são classificados quanto ao seu grau de periculosidade de classe I até a classe IV, sendo que os de classe I são os mais tóxicos, e os de classe IV os menos tóxicos. A dosagem letal, LD_{50} , determina as classes de acordo com sua periculosidade. Essa classificação foi resultado de testes de laboratório, em que é determinada a dosagem letal do agrotóxico administrados pela mesma via, oral, por exemplo, em 50 % dos animais utilizados na amostragem experimental, que são geralmente ratos ou camundongos. Estas classificações estão contidas na Tabela 2 (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009).

Tabela 2 – Classificação dos Agrotóxicos pela sua toxicidade.

Classe	Grau de Toxicidade	LD_{50}	Cor da Faixa
I	Extremamente tóxico	$\leq 5 \text{ mg kg}^{-1}$	Vermelha
II	Altamente tóxico	Entre 5 e 50 mg kg^{-1}	Amarela
III	Medianamente tóxico	Entre 50 e 500 mg kg^{-1}	Azul
IV	Pouco tóxico	Entre 500 e 5000 mg kg^{-1}	Verde
-	Muito pouco tóxico	Acima de 5000 mg kg^{-1}	-

Fonte: (PERES; MOREIRA, 2003).

A dosagem letal é determinada pela quantidade em miligramas do agrotóxico pela massa do corpo do indivíduo em quilogramas, enfatizando que a capacidade da substância de causar danos depende da quantidade absorvida pelo corpo. Portanto, quanto mais tóxico o agrotóxico, menor quantidade dele será suficiente para causar danos perigosos à saúde do indivíduo, ou ao meio ambiente como um todo (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

A forma mais simples de aplicação de agrotóxicos é a pulverização manual. Nesta, os agricultores aplicam de forma direta, com o auxílio de um pulverizador manual o agrotóxico diretamente no local a ser tratado (SOARES; PORTO, 2012), o que pode causar a contaminação tanto do cultivo, como do meio ambiente, e do próprio agricultor. Porém, tanto outros cultivos como o meio ambiente podem ser contaminados de forma indireta. Uma forma de contaminação indireta é a pulverização aérea de agrotóxicos, onde os resíduos podem ser levados pelas correntes aéreas a locais diferentes de onde são aplicados originalmente, podendo contaminar o solo, a água, e até as vegetações (PERES; MOREIRA, 2003). Essa forma de aplicação é feita principalmente com aeronaves, e é utilizada principalmente por estabelecimentos que possuem grandes áreas de cultivo, as quais a pulverização manual seria praticamente inviável. Há evidências de contaminações na água e solo de áreas do cerrado brasileiro associadas a plantações nas mesmas áreas (SOARES; PORTO, 2012). A Figura 2 mostra os 2 tipos de pulverização citados.

Figura 2 – Pulverização de agrotóxicos – manual x aérea.



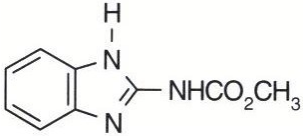
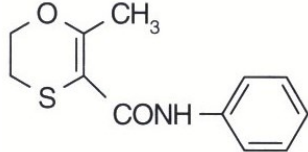
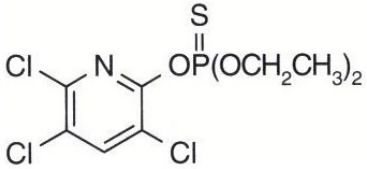
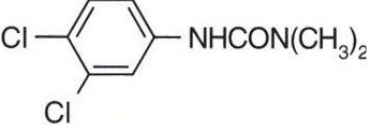
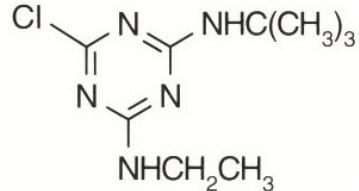
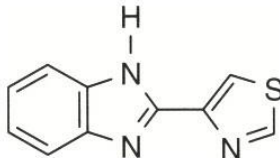
Fonte: Busca Google/imagens: pulverização manual, pulverização aérea.

Na grande maioria dos países, a produção agrícola moderna é totalmente dependente do uso de agrotóxicos. Em 2004, no Brasil, foi divulgado pelo IBGE que foram utilizados cerca de 2,8 kg de agrotóxicos por hectare plantado, colocando o Brasil em quarto lugar dos países que mais usam agrotóxicos (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009), e de 2000 a 2012, esse consumo aumentou em cerca de 200 % (CALDAS, 2016), o que supera o crescimento mundial no período de 2002 a 2012, que foi em torno de 93 %. Com esse aumento exacerbado, o Brasil se tornou, a partir de 2008, o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (FREITAS, 2018). Cerca de 50 % do total de agrotóxicos utilizados no Brasil correspondem a herbicidas, e 20 % a fungicidas, que têm sido largamente empregados para o controle de vários fungos patogênicos em frutas e verduras nos períodos pré e pós colheita, e em consequência disso, frequentemente têm sido encontrados resíduos destes em alimentos. Portanto, para minimizar os riscos de contaminação dos seres humanos e do meio ambiente por agrotóxicos, deve-se reduzir o uso de agrotóxicos principalmente nas etapas de plantio das culturas, e também deve-se realizar monitoramento nos produtos agrícolas, frutos e verduras (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009).

O cerrado Brasileiro vem sofrendo com uma grande expansão de atividades agrícolas de monoculturas em suas áreas. A baixa fertilidade do solo do cerrado intensifica o uso de agrotóxicos e fertilizantes, causando um problema não só ambiental, mas de saúde pública. Dentre várias monoculturas, pode-se destacar a cana de açúcar, milho, soja, algodão, arroz, cerqueiro e sorgo, entre outros (SOARES; PORTO, 2007). Conforme os estudos da ANVISA (ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016), alguns dos principais agrotóxicos utilizados nestas monoculturas são os seguintes: Carbendazim, Carboxina, Clorpirifós, Diuron, Terbutilazina e Tiabendazol. Devido ao potencial de uso destes agrotóxicos em áreas do cerrado Brasileiro, além da possibilidade de serem usados para

tratamento de diversas doenças e pragas que acometem o pequiizeiro, estes foram selecionados para o estudo realizado neste trabalho. A Tabela 3 traz algumas informações a respeito destes agrotóxicos.

Tabela 3 – Agrotóxicos escolhidos para estudo.

Agrotóxicos	Grupo químico	Classe	Classificação Toxicológica	Fórmula Estrutural
Carbendazim	Benzimidazol	Fungicida	Classe III	
Carboxina	Carboxanilida	Fungicida	Classe III	
Clorpirifós	Organofosforado	Inseticida, formicida e acaricida	Classe II	
Diuron	Uréia	Herbicida	Classe III	
Terbutilazina	Triazina	Herbicida	Classe III	
Tiabendazol	Benzimidazol	Fungicida	Classe IV	

Fonte: (ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2019).

Dos 6 agrotóxicos selecionados, 3 pertencem à classe dos fungicidas. Das doenças relatadas no pequiizeiro todas são causadas por fungos e, por este motivo, estes compostos podem ser utilizados de forma direta para controle dos fungos, vindo a deixar resíduos em seus frutos. Os demais, inclusive os fungicidas, por serem indicados para controle de doenças e pragas em monoculturas cultivadas na área do cerrado brasileiro, podem vir a contaminar indiretamente o pequiizeiro através das pulverizações aéreas, também deixando resíduos em seus frutos.

A ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, é o órgão público que regulamenta e fiscaliza a utilização de agrotóxicos no Brasil. O Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) foi iniciado a partir de 2001, e visa o monitoramento de frutas e verduras consumidos no Brasil, e a disponibilização das informações dos monitoramentos realizados à sociedade (PERES; MOREIRA, 2003).

Através de estudos, os agrotóxicos são classificados pela ANVISA conforme seu grau de toxicidade, são determinados o Limite Máximo de Resíduos (LMR) para os frutos monitorados, e a Ingestão Diária Aceitável (IDA), conforme exemplos contidos na Tabela 4 (ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016).

Tabela 4 – LMR (mg kg^{-1}) e IDA ($\text{mg kg}^{-1} \text{ m.c.}$) dos agrotóxicos estudados para algumas culturas agrícolas cultivadas em áreas do cerrado Brasileiro.

Agrotóxico	LMR (mg kg^{-1})				$\text{mg kg}^{-1} \text{ m.c.}$
	Algodão	Milho	Cana de Açúcar	Soja	IDA
Carbendazim	0,1	0,05	-	0,5	0,02
Carboxina	0,2	0,05	-	0,2	0,1
Clorpirifós	0,5	0,1	-	0,01	0,1
Diuron	0,1	0,05	0,1	0,2	-
Terbutilazina	-	0,1	-	-	-
Tiabendazol	-	0,2	0,01	0,1	0,1

Fonte: (ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2019).

As culturas contidas na Tabela 4 não são as únicas com dados disponibilizados pela ANVISA, existem uma série de outros alimentos estudados e monitorados, porém é notória a ausência de dados a respeito dos frutos do cerrado brasileiro. A Ingestão Diária Aceitável, IDA, é a quantidade que, ingerida diariamente durante toda a vida, parece não trazer riscos para a saúde do consumidor. A unidade expressada para a IDA é em miligramas por quilograma de massa corpórea ($\text{mg kg}^{-1} \text{ m.c.}$). O LMR é um parâmetro que indica um limite seguro de resíduos no alimento. Caso este valor seja excedido, é constatada uma irregularidade, porém não significa que a saúde do consumidor esteja em risco (ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016).

1.2 Métodos de extração de resíduos de agrotóxicos em alimentos

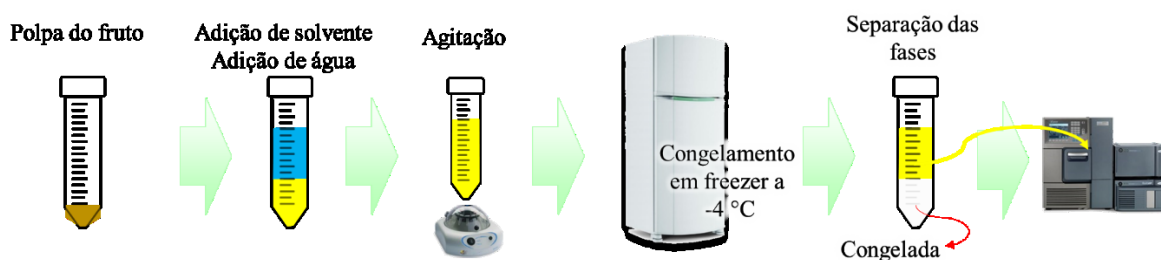
O uso de agrotóxicos possui um papel fundamental na proteção e preservação dos alimentos, porém, como pode ocorrer o uso indiscriminado, é necessário um monitoramento completo de resíduos de agrotóxicos nos alimentos. Com isso, o desenvolvimento, otimização e validação de métodos analíticos se fazem necessários para atender esta demanda da sociedade (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009). A literatura traz diversos métodos de análises de extração de resíduos destes compostos da polpa dos frutos, sendo esta a etapa mais importante do método, e deve ser realizada para cada matriz estudada, devido às características físico-químicas e composição dos frutos, que diferem muito uns entre os outros (AKRAM, *et al.*, 2017; GRANDE-MARTÍNEZ, *et al.*, 2016; SANTANA; SOARES; FARIA, 2018). Devido à ausência na literatura de um método para extração e análise de agrotóxicos em polpa de pequi, se faz necessário este trabalho, a fim de disponibilizar um método para o monitoramento destes frutos, que são cada vez mais apreciados pelos brasileiros.

A literatura descreve vários métodos de extração de resíduos de agrotóxicos, ou também a extração de multirresíduos de agrotóxicos, ou seja, a extração de resíduos de diferentes agrotóxicos em uma mesma amostra. Métodos como microextração em fase sólida (*Solid-Phase Microextraction* – SPME), baseada na extração de analitos a partir de uma fibra extratora, sem a necessidade de uso de solventes, em especial quando empregada em associação com a cromatografia gasosa (LI, *et al.*, 2018; SILVA; PAWLISZYN, 2015); extração em fase sólida (*Solid-Phase Extraction* – SPE), extração dos compostos de matrizes líquidas a partir da retenção em um adsorvente, compactado dentro de cartuchos, e posterior eluição com pequenos volumes de solventes (ARES, *et al.*, 2017; PELAJIC, *et al.*, 2016); extração líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction* – LLE), baseada na extração dos analitos de amostras líquidas com um solvente orgânico através de agitação manual, porém que emprega grandes volumes de solventes tóxicos (AKRAM, *et al.*, 2018; GIROUD, *et al.*, 2019); dispersão da matriz em fase sólida (*Matrix Solid-Phase Dispersion* – MSPD), método baseado na maceração da amostra sólida ou semi-sólida com um adsorvente, que funciona como um abrasivo rompendo as interações entre analitos e amostras e posterior empacotamento da mistura sólida em um cartucho e eluição com um pequeno volume de solvente extrator (BARRETO, *et al.*, 2017; FREITAS; SERAFIM; LANÇAS, 2018); extração em ponto nuvem (*Cloud Point Extraction* – CPE), extração de solutos de amostras líquidas por micelas de surfactantes a partir da separação de fases entre as micelas e a matriz da amostra (A-A KHAMMAS; AHMAD, 2016; KAIMAL, *et al.*, 2019); e QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), método que

consiste, de forma simplificada, em três etapas a de extração com solvente, partição com mistura de sais e extração em fase sólida dispersiva, de forma quase simultânea, resultando em extratos límpidos e com alta porcentagem de extração dos analitos (GRANDE-MARTÍNEZ, *et al.*, 2016; TIRYAKI, 2016), são comumente aplicados para execução desta determinação de agrotóxicos em alimentos. Entre todos estes métodos, o QuEChERS se destaca por ser reconhecido pela sua alta eficiência, baixo custo, fácil utilização e rapidez (ANASTASSIADES, *et al.*, 2003; PRESTES, *et al.*, 2009), porém, se comparado com outros métodos de extração, ele pode ser considerado um método muito moroso, por apresentar várias pequenas etapas durante o processo de extração. Outro método, a extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT), tem sido utilizado com frequência para a extração de multirresíduos de agrotóxicos em diversos alimentos (GOULART, *et al.*, 2019; GOULART, 2010; RODRIGUES, *et al.*, 2018; SANTANA; SOARES; FARIA, 2018). Este, se comparado às demais técnicas, possui menos etapas experimentais, e utiliza menor quantidade de solventes orgânicos, o que consequentemente gera menos resíduos e a torna um método de baixo custo (RODRIGUES, *et al.*, 2018) e, por isso, foi o método escolhido para o desenvolvimento deste trabalho.

As extrações líquido-líquido e sólido-líquido com partição em baixa temperatura apresentam o mesmo princípio, o que as diferencia é a amostra em que se deseja fazer a extração. O pequi, por exemplo, é uma amostra sólida, portanto o método utilizado para a extração de resíduos de agrotóxicos neste fruto é a extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura. Para extrações em amostras líquidas, como por exemplo bebidas, a extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura seria o método correto a ser aplicado. Este método consiste em colocar a amostra em contato com um solvente orgânico de temperatura de fusão baixa, em geral menor que -20°C , com menor densidade que a água, e que seja miscível nela. Após essa etapa, a mistura é deixada em repouso num freezer por tempo suficiente até o congelamento da água, que particionará a amostra do solvente orgânico. Na parte superior, o solvente orgânico, contendo os analitos extraídos da amostra é coletado, analisado por um método de separação e quantificado, gerando em média bons resultados percentuais de recuperação (GOULART, 2010). A Figura 3 descreve o método ESL-PBT utilizado.

Figura 3 – Esquema do método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura.



Fonte: próprio autor.

1.3 Métodos de Separação e Quantificação

Após o emprego do método de extração, como se trata de extração multirresíduos, geralmente a amostra conterá mais de um tipo de analito (agrotóxico) diferente para ser quantificado (RODRIGUES, *et al.*, 2018). Além disso, a amostra poderá conter substâncias indesejadas extraídas do próprio fruto, que interferem no sinal do analito. Portanto, para que seja possível quantificar cada agrotóxico presente na amostra, é necessário empregar um método de separação analítica (SKOOG, *et al.*, 2008).

O objetivo das técnicas de separação analítica é a eliminação ou redução das substâncias que possam interferir no sinal do analito, de forma que toda informação quantitativa dos analitos que se deseja quantificar em uma mistura complexa possa ser obtida. A literatura lista algumas técnicas de separação, entre elas, a cromatografia se destaca, pois se obtém toda informação quantitativa simultaneamente após a etapa de separação, enquanto que em outros procedimentos, as etapas de separação e quantificação são completamente distintas, e independentes uma da outra (SKOOG, *et al.*, 2008). As técnicas cromatográficas mais utilizadas atualmente para a separação e quantificação de resíduos de agrotóxicos extraídos de alimentos são a cromatografia gasosa (CG) (BARRETO, *et al.*, 2017; FREITAS; SERAFIM; LANÇAS, 2018), e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (CALDAS; GONÇALVES; PRIMEL, 2011; RODRIGUES, *et al.*, 2018).

A CLAE é uma técnica que foi desenvolvida e comercializada a partir de 1969 e, desde então, tem se destacado na determinação de diferentes substâncias químicas de polaridades distintas, e sua popularidade vem aumentando devido à grande gama de possibilidades de separação de diferentes tipos de amostras, e devido a velocidade e confiabilidade do método. A CLAE é um método físico-químico de separação, onde a separação acontece devido ao equilíbrio resultante da interação química do soluto entre duas fases, a fase estacionária (FE) e

a fase móvel (FM). A fase estacionária geralmente é constituída de uma coluna recheada em seu interior por uma fase fixa sólida ou com líquido polar ou apolar ligado ao sólido, e a fase móvel é proveniente de um reservatório de solventes, e é bombeada pela coluna com vazão constante através de uma bomba de alta pressão. A análise é iniciada quando a amostra é injetada na FM, antes da coluna da FE, através de uma válvula de injeção. Assim, a amostra é empurrada através da coluna pela fase móvel, e através das diferentes interações entre o analito com a FM e a FE, os diferentes componentes do analito serão separados, e enviados posteriormente a um equipamento de detecção, que gerará um sinal, com o qual será possível quantificar os diferentes componentes da amostra através da intensidade de cada sinal. Os equipamentos de detecção mais comuns empregados com a CLAE são o detector espectrométrico de massas (MS, *mass spectrometry*), detector espectrofotométrico de absorção no ultravioleta-visível (UV-VIS), detector por Arranjo de Diodos (DAD – UV-VIS) e detector por Fluorescência (FL) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O detector DAD (UV-VIS) possui alta resolução espectral e permite obter a cada segundo o espectro de absorção, o que possibilita a confirmação dos compostos através do espectro resultante. A cada pico gerado, as informações espectrofotométricas são geradas, e estas informações podem confirmar a identidade do pico. A versatilidade, seletividade e resolução espectral desse detector permite o seu emprego em vários tipos de amostras, por isso ele é amplamente utilizado para análises de agrotóxicos. Além disso, os resultados espectrais gerados por ele podem ser comparados com uma biblioteca de espectros para confirmação da identidade dos compostos (CALDAS; GONÇALVES; PRIMEL, 2011). A CLAE-DAD (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Arranjo de Diodos - UV-VIS) foi o método de separação / detecção utilizado neste trabalho.

1.4 Planejamento de experimentos

Os métodos de extração de resíduos de agrotóxicos em alimentos devem ser ajustados para cada matriz a ser estudada, pois as condições experimentais de cada método dependem do tipo de resíduo a ser determinado, das características químicas da matriz do alimento e da técnica de análise a ser empregada. Desta forma, independentemente do método selecionado para a extração dos resíduos de agrotóxicos, ele deve ser submetido a uma etapa de otimização antes da sua aplicação às amostras alvo das análises visando a obtenção da máxima taxa de recuperação dos resíduos da matriz da amostra.

Existem diferentes formas de realizar a otimização de um método de extração, o planejamento de experimentos tem sido uma ferramenta estatística de elevada importância neste processo para que as condições ótimas do método sejam obtidas de forma rápida, econômica e, principalmente, confiável, uma vez que as mesmas podem ser previstas por modelos matemáticos construídos com a execução do planejamento (FANG, *et al.*, 2017; HAO; LI; LIN, 2017).

O planejamento de experimentos mais comumente empregado em processos químicos é o planejamento fatorial ou planejamento fatorial completo (PFC). Em um planejamento fatorial são investigadas as influências de todos os fatores (variáveis experimentais) de interesse e os efeitos de suas interações sobre a resposta, realizando um número reduzido de experimentos. Se for avaliada a influência de k fatores experimentais, em dois níveis cada, o PFC consistirá na realização de, no mínimo, 2^k experimentos. Assim, um planejamento fatorial de 2 fatores requer no mínimo 4 experimentos para se conhecer a influência desses fatores e de sua interação sobre a resposta medida. Os fatores estudados podem ser qualitativos (categóricos) ou quantitativos. Por exemplo, a concentração de um reagente é um fator quantitativo, pois pode assumir infinitos valores entre dois níveis, já o tipo de solvente é um fator qualitativo, pois se utiliza o solvente A ou o solvente B no processo de extração (sim ou não). Os níveis dos fatores qualitativos ou quantitativos normalmente são codificados com os sinais (-) e (+), nível mínimo e máximo, respectivamente, para facilitar a construção da matriz de planejamentos e dos modelos matemáticos (BARROS NETO; BRUNS; SCARMINIO, 2010; LUNDSTEDT, *et al.*, 1998).

O planejamento fatorial requer a realização de um número mínimo de experimentos, como visto anteriormente. No entanto, esses experimentos devem ser independentes e combinar todos os níveis de todos os fatores estudados. A matriz de experimentos de um planejamento fatorial para dois fatores em dois níveis cada é apresentada na Tabela 5. Nessa matriz, a primeira coluna se refere à quantidade de ensaios necessários, a segunda e a terceira coluna se referem às condições dos fatores 1 e 2 respectivamente, que são montadas alternando os níveis dos fatores. Na segunda coluna, alterna-se o nível de um experimento para outro e na terceira, alternam-se os níveis de dois em dois experimentos, sempre iniciando pelo nível inferior (-), garantindo assim que os 4 experimentos sejam realizados com todas as combinações possíveis entre os níveis dos fatores (nenhuma linha na Tabela 5 se repete). Para um número maior de fatores as colunas seguirão a mesma lógica: para 3 fatores alternam-se os níveis a cada 4 experimentos, para 4 fatores a cada 8 experimentos e assim por diante. É importante ressaltar que os experimentos devem ser realizados de forma aleatória, não necessariamente na sequência

apresentada na Tabela 5, para impedir que fatores que não estão sendo estudados contaminem os efeitos que se deseja investigar (BARROS NETO; BRUNS; SCARMINIO, 2010; LUNDSTEDT, *et al.*, 1998).

Tabela 5 - Matriz de experimentos para um planejamento fatorial 2².

Experimentos	Fatores		
	1	2	1×2
1	-	-	+
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	+

Fonte: próprio autor.

O efeito que um determinado fator possui sobre o processo, por exemplo, na extração dos resíduos de agrotóxicos da amostra, é determinado pela diferença entre a média dos resultados obtidos para o fator no seu nível superior (+) e a média dos resultados obtidos para o fator em seu nível inferior (-), Equação 1 (BARROS NETO; BRUNS; SCARMINIO, 2010).

$$Ef_1 = \frac{\sum y_+}{n} - \frac{\sum y_-}{n} \quad (1)$$

Em que: Ef_1 é o efeito do fator 1; $\sum y_+$ é a soma de todas respostas obtidas no nível superior (+) do fator 1; $\sum y_-$ é a soma de todas respostas obtidas no nível inferior (-) do fator 1; n é o número de respostas para o fator 1 em um dado nível.

Quanto maior o valor para o efeito, maior a influência do fator na resposta para o processo investigado. O efeito de interação entre os fatores também pode ser determinado a partir do produto dos sinais dos fatores para cada experimento (4ª coluna da Tabela 5), empregando a Equação 1. Para se conhecer o erro experimental do planejamento não é necessário realizar todos os experimentos em replicatas, pode-se realizar uma medida em triplicata no ponto central (valor intermediário dos níveis dos fatores), codificados pelo valor 0 (zero). Assim, planejamentos que envolvem um mínimo de 4, 8 ou 16 experimentos requerem apenas um ensaio realizado em triplicata, pelo menos, na condição intermediária dos níveis dos fatores estudados para que seja conhecido o erro experimental (LUNDSTEDT, *et al.*, 1998).

Sabendo que diversos fatores (variáveis) atuam no processo de extração e podem ou não influenciar a taxa de recuperação dos resíduos dos agrotóxicos, é recomendado que o planejamento de experimentos seja iniciado por uma triagem de fatores. A triagem de fatores é

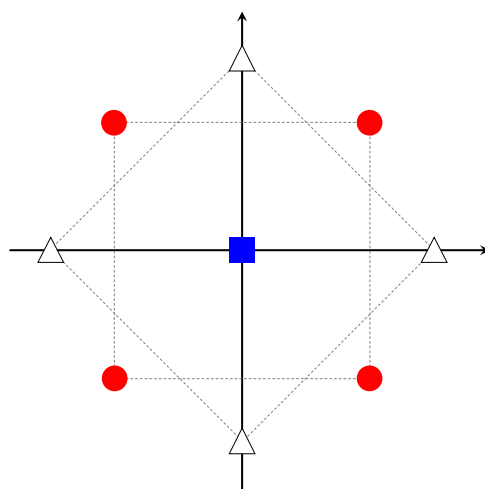
realizada através de um Planejamento Fatorial Fracionário (PFF), na qual realiza-se de forma criteriosa a avaliação de muitos fatores a partir da execução de uma quantidade reduzida (fração meia, quarta, etc.) dos experimentos necessários para um PFC. O objetivo do PFF é selecionar apenas os fatores mais importantes, aqueles que apresentam efeitos mais significativos sobre a resposta, para um estudo mais completo posteriormente. Os fatores que não foram selecionados nesta triagem devem ser fixados em um de seus níveis (já que não afetam de forma significativa a resposta) durante todo o experimento (BARROS NETO; BRUNS; SCARMINIO, 2010; LUNDSTEDT, *et al.*, 1998).

Definidos os fatores mais significativos na resposta de um dado experimento, seja por um PFC ou PFF, a otimização dos níveis desses fatores pode ser realizada a partir de um planejamento composto central (PCC). Os PCC são constituídos de 3 partes (BARROS NETO; BRUNS; SCARMINIO, 2010; LUNDSTEDT, *et al.*, 1998):

- ✓ um planejamento fatorial completo de dois níveis;
- ✓ experimentos no ponto central de todos os fatores estudados e;
- ✓ experimentos em pontos axiais, definidos por valores $x_i = \pm \alpha$, em que $\alpha = \sqrt[4]{2^k}$. Isto é, para PCC de 2 fatores os pontos axiais são definidos por valores codificados (x_i) de $\pm 1,41$.

Estes pontos são situados nos eixos de um sistema de coordenadas com distância $\pm \alpha$ da origem e formam a parte estrela do PCC, como ilustrado na Figura 4.

Figura 4 - Representação em um sistema de coordenadas dos experimentos realizados em um planejamento composto central para dois fatores. (●) planejamento fatorial, (■) ponto central e (△) planejamento axial.



Fonte: próprio autor.

A partir dos resultados obtidos com a execução dos experimentos do PCC, uma metodologia de superfícies de respostas (MSR) pode ser executada para otimização do experimento. A MSR baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas (Equação 2) para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, dão condições de explorar o sistema até sua otimização (BARROS NETO; BRUNS; SCARMINIO, 2010; LUNDSTEDT, *et al.*, 1998).

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_{12} + e \quad (2)$$

Em que: b_i são os estimadores dos parâmetros do modelo, x_i são os valores codificados dos níveis dos fatores; e é o erro experimental associado ao modelo.

O planejamento fatorial fracionário e o planejamento composto central foram empregados neste trabalho para otimizar o método de extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura de resíduos de agrotóxicos em polpa de pequi.

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e otimizar um método analítico de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura de resíduos de agrotóxicos em polpa do pequi, empregando análises por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por arranjo de diodos (UV-VIS).

Para o cumprimento deste objetivo, o trabalho foi dividido em algumas etapas:

- Desenvolver um método analítico de separação para análise dos agrotóxicos Carbendazim, Carboxina, Clorpirifós, Diuron, Terbutilazina e Tiabendazol, por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por arranjo de diodos (UV-VIS);
- Desenvolver e otimizar, através de um planejamento fatorial fracionário (PFF) e planejamento do composto central (PCC), um método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura dos agrotóxicos escolhidos para estudo.
- Avaliar algumas figuras de méritos do método desenvolvido.

3 METODOLOGIA

3.1 Reagentes, solventes e materiais

Para o desenvolvimento e otimização do método de extração dos agrotóxicos da polpa de pequi foram utilizados a mistura dos agrotóxicos (padrões analíticos de carbendazim, tiabendazol, carboxina, diuron, terbutilazina e clorpirifós, com pureza > 99 % da marca Pestanal® - SigmaAldrich, Saint Louis, MO, UA), a polpa de pequi pura adquirida no comércio local de Ituiutaba, balança analítica de 0,0001 g (Acculab, Bradford, PA, EUA), tubos Falcon® de 15,0 mL, pipetas graduadas de 5,0 mL e 10,0 mL, micropipetas (0,5 – 10 µL, 10 – 100 µL e 100 – 1000 µL), agitador vórtex (ARSEC modelo TS200, São Paulo, Brasil), agitador ultrassom (Quimis, Diadema, Brasil), centrifuga (Celm, modelo combate, São Caetano do Sul, Brasil), água ultrapurificada com resistividade maior que 18,2 MΩ cm em purificador MegaPurity (Billerica, MA, EUA), solventes acetato de etila grau cromatográfico (ECIBRA, Santo Amaro, Brasil) e acetonitrila grau cromatográfico (J.T. BAKER, São Paulo, Brasil), e freezer Consul modelo Bem Estar CRM55, para a partição em baixa temperatura.

3.2 Preparo das soluções padrão de agrotóxicos

O preparo das soluções de agrotóxicos foi realizado com solvente metanol grau cromatográfico com 99,5 % de pureza (JT Baker, Xalostoc, México), com padrões analíticos dos agrotóxicos carbendazim, carboxina, clorpirifós, diuron, terbutilazina e tiabendazol. Foi feita uma solução de concentração 1000 mg L⁻¹ para cada agrotóxico, com a pesagem de 0,0100 g, empregando uma balança analítica de 0,0001 g, e solubilização em metanol, utilizando um balão volumétrico de 10 mL. Em seguida, foi feita a diluição das amostras para concentração de 50 mg L⁻¹ cada, utilizando uma micropipeta (10 – 100 µL). Foram coletados 500 µL do agrotóxico de concentração 1000 mg L⁻¹ e transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, completando-o com metanol. As soluções foram identificadas e armazenadas em frascos de 20 mL em um freezer, e foram utilizadas para realização do desenvolvimento do método de análise por CLAE. Também foram preparados 10 mL de uma mistura dos agrotóxicos de concentração 1000 mg L⁻¹ dos 6 agrotóxicos, e esta utilizada para o desenvolvimento de método de análise por CLAE e otimização do método de extração dos resíduos de agrotóxicos.

3.3 Desenvolvimento do método de análise de agrotóxicos por CLAE-DAD

O método analítico foi desenvolvido em um cromatógrafo CLAE-DAD (CLAE Waters e2695 / DAD modelo 2998 PDA) gerenciados pelo software Empower3®, com uma coluna de aço inox de 125 mm × 3,1 mm recheada com partículas de 3 µm de fase estacionária C₁₈ X-Bridge (Waters). Os solventes utilizados para a mistura da fase móvel foram metanol grau cromatográfico/espectroscópico com 99,5 % de pureza e água ultrapurificada com resistividade maior que 18,2 MΩ cm em purificador MegaPurity (Billerica, MA, EUA), ambos filtrados em sistema de filtração de fase móvel, com funil de placa sinterizada, bomba de vácuo e kitassato de 500 mL, membrana de nylon (Millipore, Millford, CT, EUA) com porosidade de 0,22 µm e diâmetro de 45 mm, e colocados em banho ultrassom por 20 minutos, sob vácuo. O banho ultrassom a vácuo visa a eliminação de gases contidos nos líquidos, evitando assim a formação de bolhas de ar no sistema cromatográfico.

Cada padrão em concentração de 50 mg L⁻¹ foi analisado individualmente no cromatógrafo, fazendo-se a varredura espectral de 200 a 310 nm de comprimento de onda. Após isto, foi desenvolvido o método para separação dos agrotóxicos, analisando-se a mistura dos 6 agrotóxicos, em concentração de 50 mg L⁻¹, avaliando o modo isocrático/gradiente, tempo da corrida cromatográfica, os tempos de retenção dos compostos, a resolução entre picos e o comprimento de onda de máxima absorção para cada agrotóxico.

3.4 Desenvolvimento e otimização do método ESL-PBT de agrotóxicos de polpa de pequi

A extração dos agrotóxicos da polpa de pequi foi otimizada para obtenção da máxima recuperação dos resíduos sem a interferência de componentes da matriz da amostra. O método escolhido para a extração foi a extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura. As condições do método foram otimizadas a partir de um planejamento estatístico. Inicialmente foi realizada uma seleção dos fatores mais significativos na extração dos agrotóxicos da polpa de pequi através de um planejamento fatorial fracionário (PFF). Foram escolhidos 8 fatores em dois níveis cada, conforme apresentados na Tabela 6, obtidos através da avaliação de trabalhos na literatura empregando o método ESL-PBT (GOULART, *et al.*, 2019; GOULART, 2010; RODRIGUES, *et al.*, 2018; SANTANA; SOARES; FARIA, 2018).

Tabela 6 – Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial fracionário para a ESL-PBT de agrotóxicos em polpa de pequi.

Fatores		Nível (-)	Nível (+)
A	Solvente	Acetonitrila	Acetato de etila
B	Volume de Solvente / mL	4,0	8,0
C	Tempo de Congelamento / h	3	12
D	Massa de Amostra (polpa) / g	0,5000	1,000
E	Volume de Água / mL	2,0	4,0
F	Centrifugação	Não	Sim
G	Agitação	Vórtex	Ultrassom
H	Tempo de Contato (polpa/agrotóxicos) / min	15	30

Fonte: próprio autor.

Os fatores e seus níveis apresentados na Tabela 6 foram combinados em um PFF 2^{8-4} , em 16 experimentos, conforme Tabela 7. O planejamento dos experimentos para os fatores E, F, G e H foram construídos a partir da interação dos fatores A, B, C e D, de forma que os 16 experimentos envolvem condições distintas entre si.

Tabela 7 – PFF para avaliação dos fatores que afetam as respostas de forma significativa na extração de agrotóxicos de polpa de pequi. Fatores $E = A \times B \times C$, $F = B \times C \times D$, $G = A \times B \times C \times D$, $H = A \times C \times D$.

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

Fonte: próprio autor.

As extrações dos agrotóxicos da polpa de pequi pelo método ESL-PBT envolveram a pesagem da massa (0,5000 ou 1,0000 g) de amostra fortificada com 50 µL da mistura de agrotóxicos a 1000 mg L⁻¹. Durante a fortificação foi realizada a agitação por Vórtex ou em banho ultrassom por 1 min. Em seguida, a polpa fortificada foi deixada em repouso à temperatura ambiente (~ 27 °C) por 15 ou 30 min, de acordo com o planejamento, para estabelecer o contato entre os agrotóxicos e componentes da polpa de pequi. Após o período, foi adicionado o solvente extrator (acetonitrila ou acetato de etila) em volumes de 4 ou 8 mL à amostra fortificada, agitando por 1 min em agitador Vórtex ou em banho ultrassom. A mistura foi deixada em repouso por 5 min após a agitação. Logo após, foram adicionados 2 ou 4 mL de água ultrapura à mistura e submetida a agitação por 1 min em agitador Vórtex ou em banho ultrassom. O tubo contendo a mistura foi (ou não, dependendo do planejamento) centrifugado e levado ao congelamento em freezer a -4 °C para a partição à baixa temperatura por pelo menos 3 h (ou 12h). Do extrato, fase superior e não congelada, foi retirada uma alíquota de 1 mL e submetida à análise cromatográfica, empregando o método de análise desenvolvido.

Após a realização do PFF, alguns dos fatores foram fixados, por serem fatores categóricos (qualitativos) ou por não apresentarem efeitos significativos nos resultados. No entanto, dois dos fatores estudados foram submetidos a um segundo planejamento estatístico, o planejamento composto central (PCC), em 2 níveis cada, com 3 repetições no ponto central (nível intermediário de cada fator), realizando 11 experimentos no total, conforme matriz de experimentos apresenta na Tabela 8. Os valores -1,41 e 1,41 são os pontos axiais, os quais seu valor é calculado com a Equação 3.

$$X = \frac{\text{Valor real} \pm \text{Valor no ponto central}}{\frac{\text{Valor nível}_+ - \text{Valor nível}_-}{2}} \quad (3)$$

Onde X é o valor codificado para o volume do solvente, Valor nível₊ e Valor nível₋ os pontos axiais, Valor real a conversão valor codificado, e Valor no ponto central é o valor definido no PFF para o ponto central do PCC.

A partir dos resultados da extração foi construída uma superfície de resposta (com auxílio do software Statistica®), para otimização dos níveis dos dois fatores.

Tabela 8 – Matriz de experimentos para o planejamento composto central visando a otimização do método ESL-PBT de agrotóxicos em polpa de pequi. Variáveis: volume de água e de solvente extrator.

Exp.	B – Volume de solvente	E – Volume de água
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	-1,41	0
9	1,41	0
10	0	-1,41
11	0	1,41

Fonte: próprio autor.

3.4 Validação de alguns parâmetros analíticos do método

A metodologia de determinação de resíduos de agrotóxicos da polpa de pequi por extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura foi validada quanto a alguns parâmetros analíticos, como faixa de trabalho, linearidade, sensibilidade, limite de quantificação e efeito matriz.

Faixa de trabalho: Faixa de concentrações dos agrotóxicos estabelecida pelos intervalos das curvas analíticas.

Linearidade: A linearidade da metodologia foi determinada a partir do coeficiente de correlação linear (r) obtido da relação entre a faixa de concentrações dos agrotóxicos e a resposta obtida para estas concentrações no sistema de detecção cromatográfica.

Sensibilidade: A sensibilidade da metodologia de determinação de resíduos de agrotóxicos em polpa de pequi foi determinada a partir da medida do coeficiente angular da equação da reta da curva analítica.

Limite de quantificação: O limite de quantificação do método foi determinado pela injeção consecutiva de soluções padrão dos agrotóxicos em concentrações decrescentes no sistema cromatográfico até a obtenção do menor sinal no cromatograma capaz de ser quantificado com precisão, desvio padrão relativo menor que 20 % (SANTE, 2018; RIBANI, *et al.*, 2004). As soluções com diferentes concentrações dos agrotóxicos injetadas no sistema cromatográfico iniciaram em 0,500 mg L⁻¹.

Efeito matriz: A interferência de componentes da polpa de pequi na recuperação dos agrotóxicos foi avaliada a partir do efeito matriz. Neste estudo foram feitas extrações da polpa sem fortificação dos agrotóxicos e o extrato foi fortificado com diferentes alíquotas de solução padrão a 1000 mg L^{-1} da mistura dos agrotóxicos estudados, obtendo concentrações nos mesmos níveis da curva analítica preparada em solvente. O efeito matriz foi calculado a partir da comparação das curvas analíticas preparadas em solvente e na matriz da polpa de pequi de acordo a Equação 4:

$$\%EM = \left[\left(\frac{S_{matriz}}{S_{solvente}} \right) \times 100 - 100 \right] \quad (4)$$

Em que: %EM é a porcentagem do efeito matriz, S_{matriz} é o coeficiente angular da equação da reta da curva analítica preparada na matriz da polpa de pequi, $S_{solvente}$ é o coeficiente angular da equação da reta da curva analítica preparada em metanol.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento do método de análise dos resíduos de agrotóxicos por CLAE-DAD

A primeira etapa no desenvolvimento da metodologia para determinação dos resíduos dos agrotóxicos na polpa de pequi foi o desenvolvimento de um método de separação da mistura de agrotóxicos por CLAE-DAD. A obtenção da separação dos picos dos agrotóxicos foi alcançada com uma eluição da fase móvel metanol:água no modo gradiente, a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, de acordo com a Tabela 9.

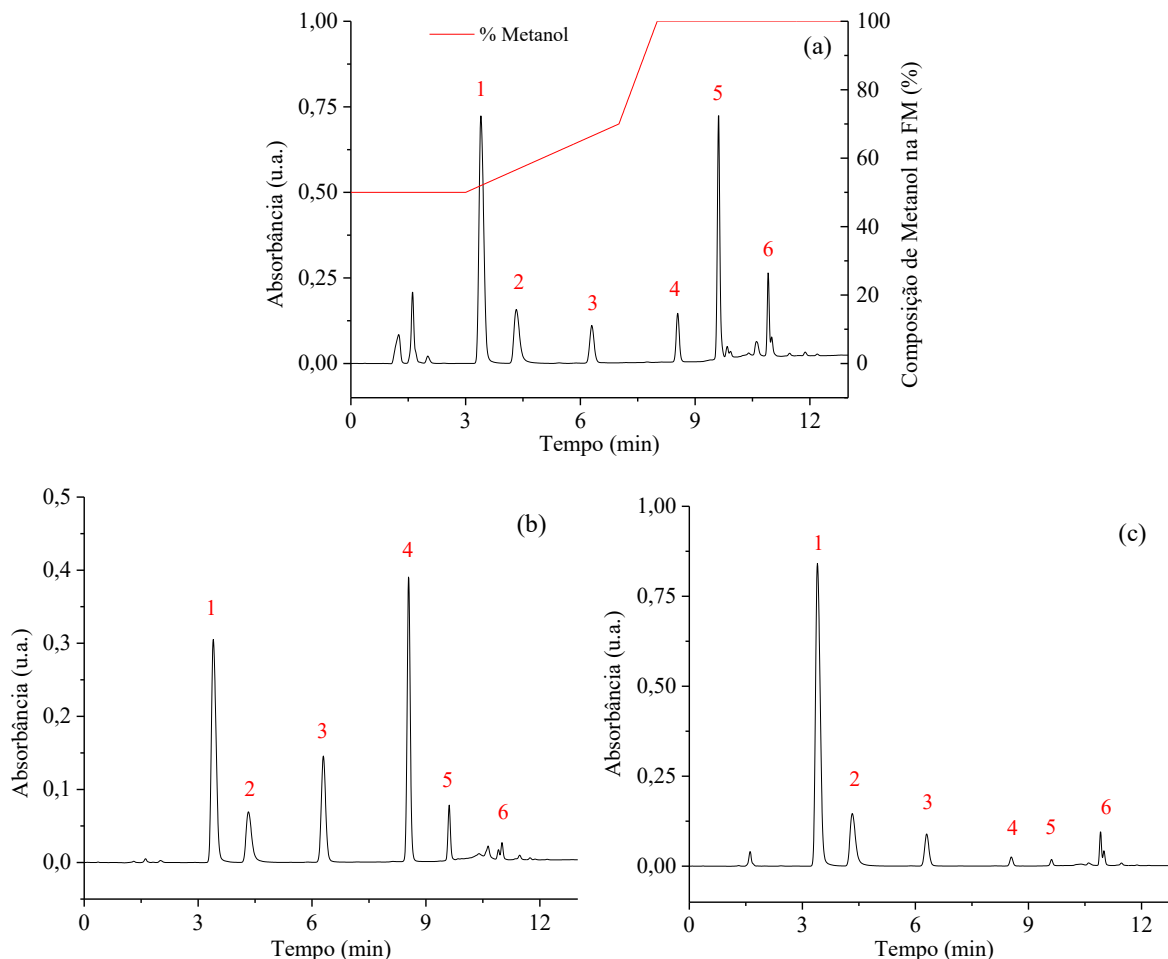
Tabela 9 – Gradiente de separação dos agrotóxicos a serem determinados em polpa de pequi por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (UV-VIS).

Tempo (min)	Vazão (mL min^{-1})	% água	% metanol
0	1,0	50	50
3	1,0	50	50
7	1,0	30	70
8	1,0	0	100
12	1,0	0	100
13	1,0	50	50

Fonte: próprio autor.

Com estas condições, foi possível a separação completa de todos 6 agrotóxicos estudados, conforme pode ser observado nos cromatogramas da Figura 5. Na Figura 5 (a), a linha vermelha acima do cromatograma mostra a composição percentual de metanol na fase móvel pelo tempo da corrida cromatográfica, conforme gradiente na Tabela 9.

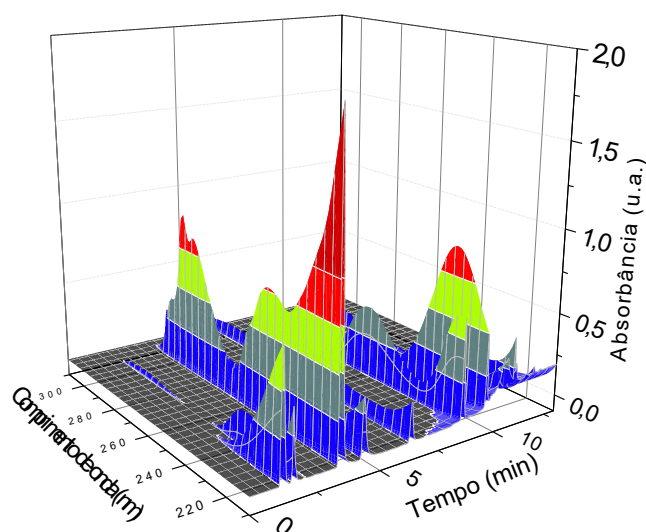
Figura 5 – Cromatogramas da separação da mistura de agrotóxicos a 5 mg L^{-1} desenvolvida neste trabalho para análise e quantificação em extratos de polpa de pequi. Condições de fase móvel vide Tabela 9. Detecção DAD a (a) 230 nm (com composição de metanol na FM – linha vermelha), (b) 254 nm e (c) 285 nm.



Fonte: próprio autor.

O detector por arranjo de diodos (UV-VIS) possibilita a quantificação dos agrotóxicos no máximo de absorção de cada composto, pois possibilita a varredura espectral durante a análise cromatográfica. A varredura espectral de 200 – 300 nm, a partir das injeções individuais dos padrões dos agrotóxicos em concentração 50 mg L^{-1} no CLAE-DAD, resultou nos comprimentos de onda de máxima absorção para cada um dos agrotóxicos estudados contidos na Tabela 10, e a injeção do mix de agrotóxicos em concentração 50 mg L^{-1} no CLAE-DAD resultou no cromatograma tridimensional da separação dos agrotóxicos na Figura 6. Essa análise se faz necessária pois, para uma maior sensibilidade do método, deve-se selecionar o comprimento de onda de máxima absorção para cada agrotóxico estudado.

Figura 6 - Cromatograma 3D da separação dos agrotóxicos empregados no Pequi na faixa de 200-310 nm. Condições de fase móvel vide Tabela 9.



Fonte: próprio autor.

Tabela 10 – Comprimentos de onda (λ) de máxima absorção dos agrotóxicos analisados.

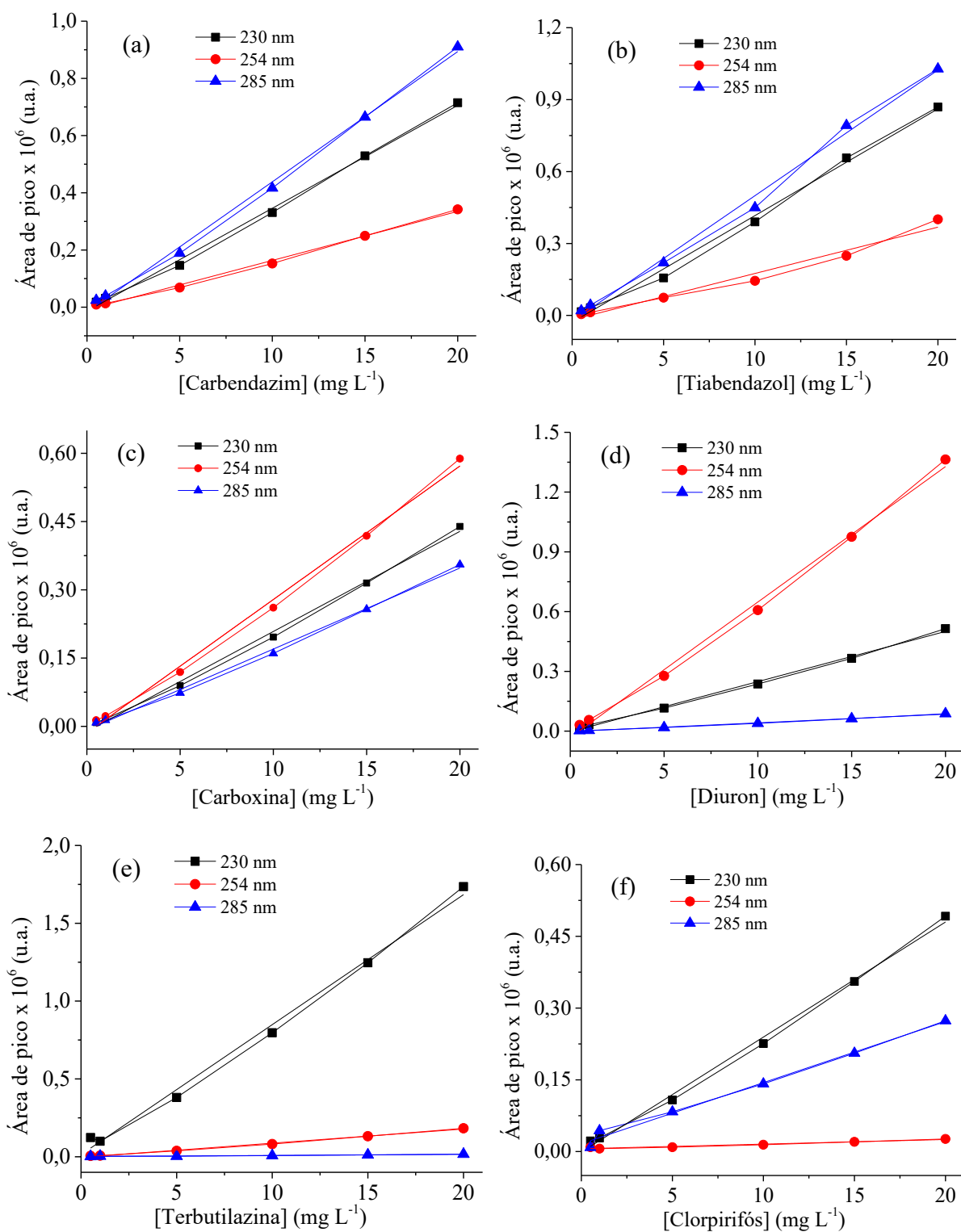
Agrotóxico	λ_1 (nm)	λ_2 (nm)
Carbendazim	286,5	-
Carboxina	250,9	294,8
Clorpirifós	229,6	290,1
Diuron	215,5	249,7
Terbutilazina	223,7	-
Tiabendazol	242,6	298,4

Fonte: próprio autor.

Como pode ser observado na Tabela 10, alguns dos compostos apresentam duas bandas de absorção. Para a quantificação dos agrotóxicos, três comprimentos de onda foram monitorados durante a separação cromatográfica e fixados para as demais análises do trabalho: 230, 254 e 285 nm, garantindo assim uma maior detectabilidade para os agrotóxicos.

Os comprimentos de onda escolhidos para a quantificação de cada agrotóxico foram determinados pela maior inclinação da curva que relaciona as concentrações dos agrotóxicos com as absorbâncias obtidas nos três comprimentos de onda selecionados, de acordo com a Figura 7.

Figura 7 – Relação entre as concentrações dos agrotóxicos com a absorbância obtida nos comprimentos de onda de 230, 254 e 285 nm e ajustes lineares. (a) carbendazim, (b) tiabendazol, (c) carboxina, (d) diuron (e) terbutilazina e (f) clorpirifós.



Fonte: próprio autor.

A Figura 7 mostra a comparação, por comprimento de onda (λ), das injeções da mistura dos agrotóxicos em diferentes concentrações para elaboração das curvas analíticas e análises dos agrotóxicos. A maior inclinação da curva indica a maior sensibilidade analítica do método. Desta forma, definiram-se os seguintes comprimentos de onda para análise dos agrotóxicos: carbendazim e tiabendazol a 285 nm, carboxina e diuron a 254 nm e terbutilazina e clorpirifós a 230 nm. Esta seleção está em acordo com as máximas absorções para os compostos apresentadas na Tabela 10, e também leva em consideração as linearidades das curvas analíticas.

4.2 Desenvolvimento e otimização do método de extração ESL-PBT

4.2.1 Seleção de fatores (Planejamento Fatorial Fracionário)

Para a extração dos agrotóxicos da polpa de pequi foi escolhido o método de extração em fase sólida com partição a baixa temperatura (ESL-PBT), por se tratar de um procedimento simples, com poucas etapas e baixa interferência do analista comparado a outros métodos de extração. No entanto, como o pequi apresenta características e composição química própria e não foi, até o momento, submetido a processos de extração é importante estabelecer as condições adequadas para que os resíduos de agrotóxicos possam ser extraídos com a máxima eficiência possível de sua matriz.

A otimização do método de extração ESL-PBT foi realizada a partir de um planejamento estatístico, iniciado com um Planejamento Fatorial Fracionário (PFF) para selecionar os fatores que possuem maior influência na recuperação dos agrotóxicos na polpa de pequi. Foram avaliados 8 fatores em dois níveis cada, realizando um total de 16 extrações ESL-PBT dos agrotóxicos na polpa de pequi nesta etapa, combinando os níveis dos 8 fatores (Tabela 7). Os resultados de recuperação dos seis agrotóxicos para esses experimentos são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Recuperações (%) dos agrotóxicos da polpa de pequi a partir da extração ESL-PBT resultantes do PFF com os desvios padrão de 3 medidas.

Exp.	Carbendazim	Tiabendazol	Carboxina	Diuron	Terbutilazina	Clorpirifós
1	51,2 ± 1,4	53,5 ± 2,5	46,0 ± 2,6	47,5 ± 2,3	24,5 ± 4,2	3,6 ± 3,4
2	76,6 ± 2,1	85,6 ± 5,7	101,3 ± 1,1	102,3 ± 1,3	98,0 ± 1,9	114,4 ± 2,1
3	58,2 ± 2,4	58,0 ± 4,7	53,8 ± 2,7	54,8 ± 3,1	29,7 ± 1,8	2,3 ± 0,5
4	74,9 ± 10,1	80,7 ± 8,8	82,1 ± 8,6	84,5 ± 8,8	76,6 ± 7,4	82,4 ± 4,4
5	45,2 ± 2,0	46,5 ± 1,3	40,6 ± 0,8	40,8 ± 1,1	16,9 ± 0,5	8,4 ± 1,2
6	72,0 ± 9,1	74,9 ± 8,7	78,5 ± 9,7	80,4 ± 9,2	75,4 ± 9,6	83,5 ± 10,3
7	64,8 ± 1,2	66,1 ± 7,3	61,3 ± 4,1	62,4 ± 4,2	38,7 ± 4,9	1,6 ± 0,3
8	80,0 ± 3,9	84,6 ± 4,4	93,8 ± 1,5	95,4 ± 2,2	88,0 ± 0,7	108,1 ± 3,3
9	49,4 ± 2,5	52,3 ± 2,2	38,3 ± 2,1	39,7 ± 2,6	13,6 ± 1,1	7,3 ± 4,5
10	54,0 ± 6,2	48,8 ± 4,9	47,4 ± 5,8	49,4 ± 6,2	43,4 ± 6,0	49,1 ± 7,0
11	54,9 ± 2,3	54,2 ± 2,8	49,1 ± 1,7	49,9 ± 1,6	24,4 ± 1,3	1,8 ± 0,1
12	85,8 ± 1,0	87,6 ± 0,4	92,1 ± 0,5	92,0 ± 0,6	88,8 ± 5,3	118,0 ± 16,4
13	44,5 ± 3,9	43,9 ± 4,0	39,1 ± 3,6	39,8 ± 3,8	20,2 ± 3,7	12,4 ± 1,1
14	80,7 ± 11,7	89,5 ± 8,2	96,4 ± 6,5	96,3 ± 6,8	94,3 ± 5,4	127,7 ± 4,7
15	66,5 ± 1,1	67,5 ± 2,3	58,7 ± 1,9	58,9 ± 1,7	25,2 ± 1,5	2,1 ± 0,2
16	57,7 ± 2,7	65,4 ± 3,7	62,2 ± 1,6	64,3 ± 1,9	53,2 ± 1,0	81,8 ± 2,6

Fonte: próprio autor.

Todas extrações foram realizadas em triplicata. Os resultados representam a média das 3 extrações para cada experimento ± o desvio padrão. De uma forma geral, observam-se que apenas alguns dos experimentos (ensaios 2, 4, 6, 8, 12 e 14) apresentaram extrações consideradas eficientes, entre 70 e 120 % (SANTE, 2018), para média de todos os agrotóxicos. Com os desvios padrão, calculou-se a estimativa da variância conjunta para o experimento de acordo com a Equação 5.

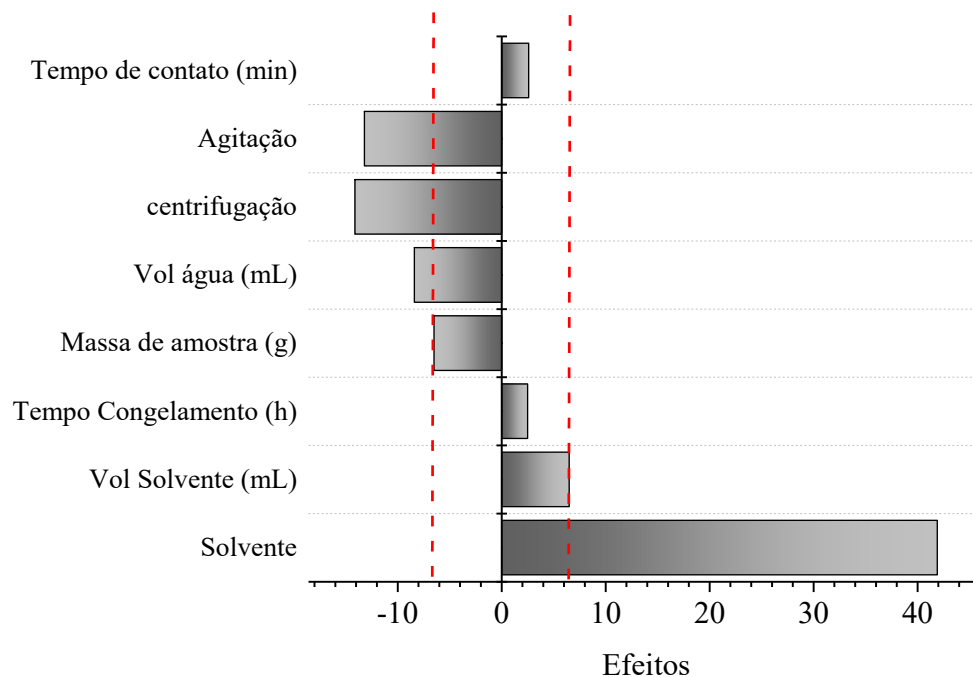
$$S^2 = \frac{v_1 s_1^2 + v_2 s_2^2 + \dots + v_m s_m^2}{v_1 + v_2 + \dots + v_m} \quad (5)$$

Em que: s_i^2 é a variância individual para cada experimento, $v_i = n_i - 1$ é o número de graus de liberdade para s_i^2 e s^2 é a estimativa conjunta da variância do PFF.

O cálculo resultou em um erro experimental padrão de 4,9 % e que gerou um intervalo de confiança ao nível de 95 % pelo teste t de $\mu = \pm 6,5$ %. Utilizando a Equação 1 (pág. 23), calcularam-se os efeitos para os fatores estudados sobre a extração e recuperação dos

agrotóxicos em polpa de pequi. Os resultados obtidos para os efeitos estão contidos no gráfico de Pareto (Figura 8).

Figura 8 – Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial fracionário 2^{8-4} da extração em fase sólida com partição a baixa temperatura de agrotóxicos de polpa de pequi.



Fonte: próprio autor.

O fator que apresentou resultado de efeito dentro do intervalo de confiança, pelo teste *t* ao nível de 95 % de confiança, não possui efeito significativo na recuperação dos agrotóxicos da polpa de pequi. O fator A, tipo de solvente, é um fator categórico (qualitativo) e, por ter valor de efeito muito superior ao erro padrão do efeito, teve uma alta influência no resultado, sendo fixado como solvente extrator dos agrotóxicos da polpa de pequi o acetato de etila.

O acetato de etila possui capacidade de extração de agrotóxicos de diversas classes e tipos de matrizes, com exceção de agrotóxicos de caráter básico e altamente polares, porém possui menor miscibilidade em água que a acetonitrila (outro solvente testado), o que facilita sua partição em baixa temperatura (SARMENTO, 2016). O acetato de etila (índice de polaridade 4,4) possui maior hidrofobicidade que a acetonitrila (índice de polaridade 5,8) (VENKATARAMAN; CHADHA, 2015), por isso é indicado para extrações de analitos moderadamente polares (JARDIM, 2010), como é o caso dos agrotóxicos estudados, que possuem coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) (Carbendazim, 1,52; Tiabendazol, 2,47; Carboxina, 2,14; Diuron, 2,68; Terbutilazina, 3,21; Clorpirifós, 4,96) (U.S. National Library of

Medicine, 2019), possuindo moderada polaridade, o que condiz com os resultados obtidos no PFF.

Os fatores C (tempo de congelamento) e H (tempo de contato) não tiveram influência considerável nos resultados, e por isso foram fixados nos seus menores níveis (C - 3 h de congelamento) e (H - 15 min de tempo de contato). Desta forma, ganha-se maior frequência de preparação de amostras devido à diminuição do tempo gasto nesta etapa. A PBT é um dos passos mais importantes do método de extração, pois separa completamente as fases particionando o analito para a fase extratora, e que possibilita a obtenção de um extrato com pequena quantidade de componentes da polpa do fruto (COSTA, *et al.*, 2015). A Figura 9 apresenta uma foto do extrato da polpa de pequi, em que se percebe uma solução translúcida, porém amarela, indicando que alguns componentes da polpa de pequi, fortemente colorida, são co-extraídos com os analitos. O que os resultados indicaram no PFF é que o tempo de 3 horas de congelamento foi suficiente para a PBT, pois acredita-se que a migração dos analitos para a fase orgânica ocorre antes do congelamento da fase aquosa (GOULART, 2010). Como este fator apresentou efeito dentro do intervalo de confiança ao nível de 95 % pelo teste *t*, a consideração de um tempo de congelamento menor otimiza o tempo total de análise sem interferir no resultado da recuperação.

Figura 9 – Extrato da polpa de pequi típico obtido a partir da ESL-PBT de agrotóxicos empregando planejamento fatorial fracionário.



Fonte: próprio autor.

Os fatores F (centrifugação) e G (tipo de agitação), que são fatores categóricos (ou sim ou não) apresentaram efeitos significativos na recuperação dos agrotóxicos e foram fixados nos níveis que resultaram em maior resposta (F - sem centrifugação) e (G - agitação Vórtex). A composição do pequi, por possuir diversos componentes hidrossolúveis, favorece a permanência desses compostos com certa polaridade na fase aquosa (açúcares, ácidos graxos).

Por isso, a centrifugação não teve efeito positivo na recuperação dos agrotóxicos. A maior influência da agitação vórtex que a agitação por ultrassom na ESL-PBT dos agrotóxicos da polpa pode ser explicada devido à maior intensidade da agitação. Uma agitação mais vigorosa aumenta o contato entre o solvente orgânico e a polpa do fruto e, consequentemente o número de colisões moleculares, facilitando assim as interações entre o solvente e as moléculas de agrotóxicos, contribuindo para maximizar as porcentagens de extração (DUARTE; DORES; VILLA, 2016).

O fator D (massa da polpa de pequi) apresentou um efeito no limite inferior do intervalo de confiança para os efeitos, indicando uma influência moderada a baixa na resposta (Figura 8). Devido à dificuldade de pesagem da massa exata da polpa, uma vez que ocorre o derretimento da polpa durante essa etapa, o seu nível de maior resposta foi fixado, ou seja, a massa de amostra considerada na extração foi de 0,5000 g. Os fatores B (volume de solvente) e E (volume de água) foram levados para a etapa de otimização através do planejamento composto central empregando metodologia de superfície de resposta, apesar de apresentarem efeitos significativos nos limites do intervalo de confiança para os efeitos, conforme observa-se no gráfico de Pareto (Figura 8). Comumente, a relação entre esses fatores são importantes no processo de ESL-PBT e são otimizados para a extração máxima dos resíduos de agrotóxicos em alimentos conforme observa-se na literatura (COSTA, *et al.*, 2015; GOULART, 2010; GOULART, *et al.*, 2019; SANTANA; SOARES; FARIA, 2018).

4.2.2 Otimização da ESL-PBT de agrotóxicos da polpa de pequi (Planejamento Composto Central)

A partir da fixação dos níveis de melhor resposta de alguns dos fatores estudados no PFF e da seleção dos fatores volume de solvente extrator e volume de água para otimização, foi realizado um planejamento composto central (PCC) a partir de 11 experimentos de ESL-PBT dos agrotóxicos de polpa de pequi com esses dois fatores em dois níveis (vide Tabela 8, pág. 31). As porcentagens de extrações para os seis agrotóxicos de acordo com os experimentos realizados no PCC estão apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 – Porcentagens de recuperação dos agrotóxicos extraídos da polpa de pequi pelo método ESL-PBT de acordo com os experimentos do PCC.

Exp.	Recuperação (%)					
	Carbendazim	Tiabendazol	Carboxina	Diuron	Terbutilazina	Clorpirifós
1	89,6	87,1	88,3	91,4	87,3	100,9
2	95,5	95,6	96,8	99,7	89,4	97,4
3	91,7	93,9	98,4	102,0	92,6	101,7
4	94,1	90,8	94,8	100,5	90,1	90,6
5	90,4	93,5	97,8	103,7	95,8	98,3
6	91,8	90,6	95,5	100,8	91,1	95,3
7	93,3	92,8	96,6	102,6	95,2	97,1
8	84,5	90,0	96,5	102,1	96,0	102,5
9	86,7	84,1	83,3	88,2	76,3	71,0
10	90,2	94,1	92,3	97,5	88,2	90,3
11	88,2	89,4	97,9	103,1	96,8	103,5

Fonte: próprio autor.

Conforme observa-se na Tabela 12, a recuperação para todos os agrotóxicos ficou na faixa de 71,0 a 103,7 % estando de acordo com a faixa recomendada para recuperações de resíduos de agrotóxicos em alimentos (SANTE, 2018), independente da condição utilizada no PCC. Este resultado é um indicativo que as definições dos níveis fixados dos fatores no PFF foram satisfatórias. No entanto, para proceder a otimização do método ESL-PBT optou-se por retirar a média das extrações dos seis agrotóxicos em cada experimento e fazer os devidos tratamentos dos dados sobre essa média. Caso a otimização do método fosse realizada individualmente para cada agrotóxico, ao mesmo tempo que o resultado de recuperação de um agrotóxico melhorasse poderia haver uma piora no resultado de recuperação de outro agrotóxico. Por esse motivo a otimização foi realizada levando-se em consideração os resultados médios de extração de todos os agrotóxicos para cada um dos experimentos (Tabela 13), mantendo sempre os resultados individuais dentro do limite recomendado pelo protocolo europeu de validação analítica (SANTE, 2018). O desvio padrão dos resultados de recuperação média dos agrotóxicos no ponto central, experimentos 5, 6 e 7, ficou em 1,30 %, muito abaixo do recomendado pelo protocolo europeu de validação analítica, que estabelece que resultados consistentes devem manter o desvio padrão relativo dentro de ± 20 % (SANTE, 2018) Os resultados individuais de desvio padrão relativo para cada agrotóxico também apresentaram a mesma tendência (Carbendazim: 1,45 %; Tiabendazol: 1,52 %; Carboxina: 1,19 %; Diuron: 1,47 %; Terbutilazina: 2,54 %; Clorpirifós: 1,51 %).

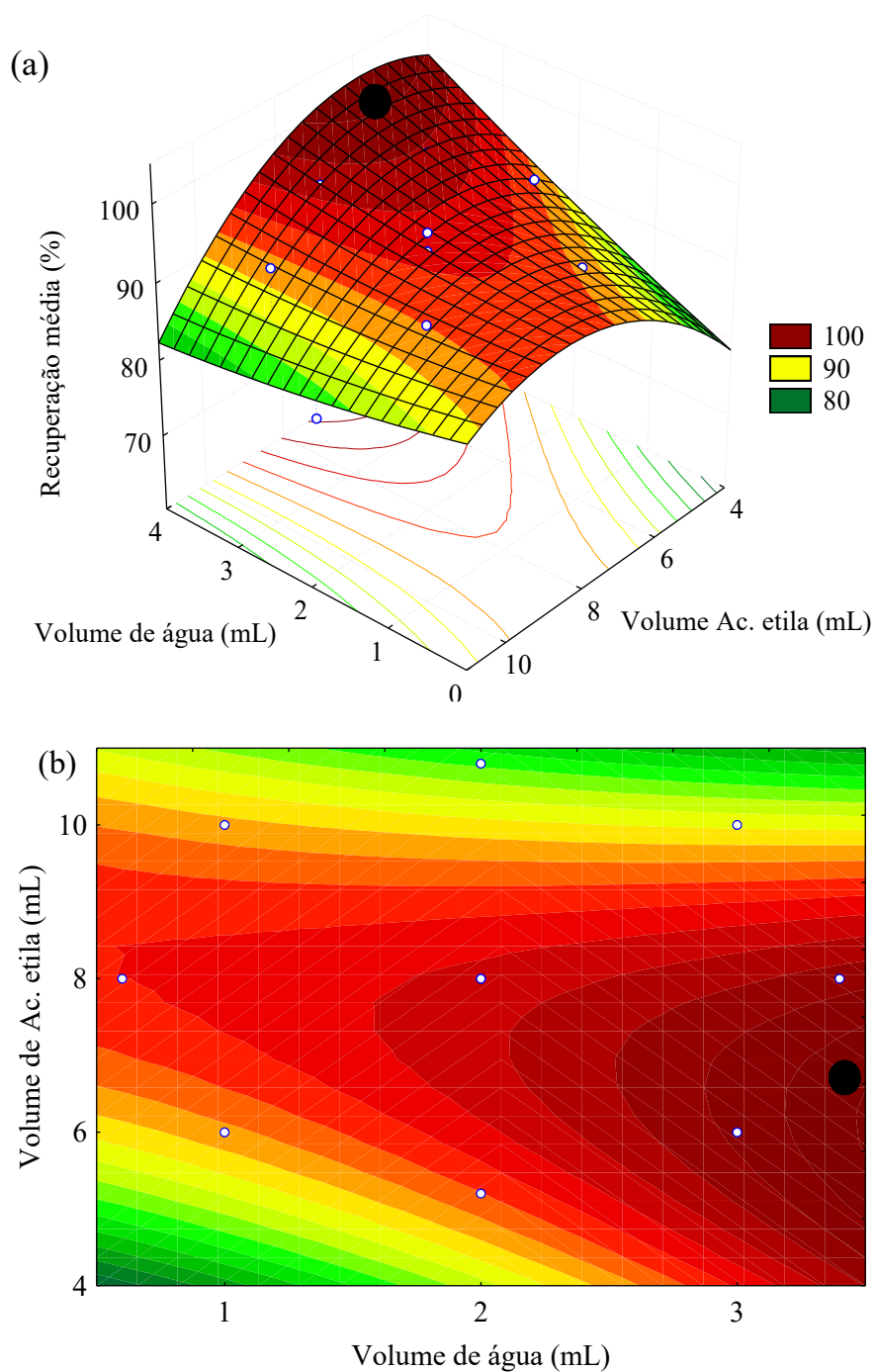
Tabela 13 – Porcentagens de recuperação média dos agrotóxicos obtidos pela ESL-PBT de polpa de pequi de acordo com os experimentos do PCC. Níveis vide Tabela 8.

Exp.	V acetato de etila (mL)	V água (mL)	R (%)
1	6	1	90,8
2	10	1	95,7
3	6	3	96,7
4	10	3	93,5
5	8	2	96,6
6	8	2	94,2
7	8	2	96,2
8	5,2	2	95,3
9	10,8	2	81,6
10	8	0,6	92,1
11	8	3,4	96,5

Fonte: próprio autor.

Conforme observado na Tabela 13 apenas uma das extrações resultou em uma média de recuperação abaixo de 90 %, as demais permaneceram acima deste valor. Os resultados médios de recuperação de todos agrotóxicos podem esconder uma recuperação baixa de algum agrotóxico, porém todos os resultados estiveram dentro do recomendado pelo protocolo europeu de validação analítica (SANTE, 2018), conforme visto na Tabela 12. Os volumes de acetato de etila e água (pontos axiais nos experimentos de 8 a 11) foram calculados a partir da Equação 3 (pág. 30).

Figura 10 – Metodologia de superfície de respostas para a ESL-PBT de resíduos de agrotóxicos em polpa de pequi de acordo com o planejamento composto central.



Fonte: próprio autor.

Os pontos em branco da Figura 10 (a e b) foram os valores médios de recuperação obtidos experimentalmente, também contidos na Tabela 13, porém com valores de recuperação % diferentes dos definidos pela superfície de resposta. De acordo com a superfície de resposta obtida para os experimentos do PCC apresentada na Figura 10, pode ser observado que a maior

porcentagem de extração é obtida quando o volume de água está em torno de 3,4 mL (valor codificado = +1,4) e o volume de solvente em torno de 7,2 mL (valor codificado = -0,4). Esse ponto foi destacado em preto na Figura 10, que resulta em uma recuperação média dos agrotóxicos de 99,6 %. As curvas de nível da Figura 10 indicam os limites em que o modelo de superfície de resposta correspondem a um certo percentual de recuperação média dos agrotóxicos, conforme a legenda por cores.

Os resultados de recuperação média dos agrotóxicos obtida pelo método ESL-PBT foram convertidos em uma equação polinomial de segunda ordem em função das duas variáveis independentes (volume de solvente e volume de água). Consequentemente, o modelo polinomial que descreve a correlação entre a resposta e as variáveis seguiu a forma geral definida pela Equação 2 (pág. 25). A equação polinomial obtida é apresentada na Equação 6.

$$R(\%) = 95,3 + 2,5 \times V_{H_2O} - 4,1 \times V_{solv} - 5,6 \times V_{solv}^2 \quad (6)$$

Este modelo polinomial explica apenas cerca de 22 % da variação da resposta nos experimentos do PCC, apresentando, portanto, falta de ajuste que o impossibilita ser usado como um preditor da eficiência da extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura dos agrotóxicos da polpa de pequi. Assim, a análise das curvas de nível da Figura 10 foi suficiente para definir os valores otimizados dos volumes de água e de acetato de etila para a extração de resíduos de agrotóxicos de polpa de pequi pelo método ESL-PBT.

Com isso, foram otimizadas as 8 variáveis inicialmente selecionadas na ESL-PBT que resultaram na extração dos 6 agrotóxicos estudados, com recuperação dentro da faixa estipulada pelo protocolo europeu de validação analítica (SANTE, 2018), tanto para a média das recuperações, como para as taxas de recuperação individuais de cada agrotóxico. As condições otimizadas no método ESL-PBT estão apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14 – Fatores e níveis otimizados no processo de extração sólido-líquido com partição à baixa temperatura de agrotóxicos em polpa de pequi.

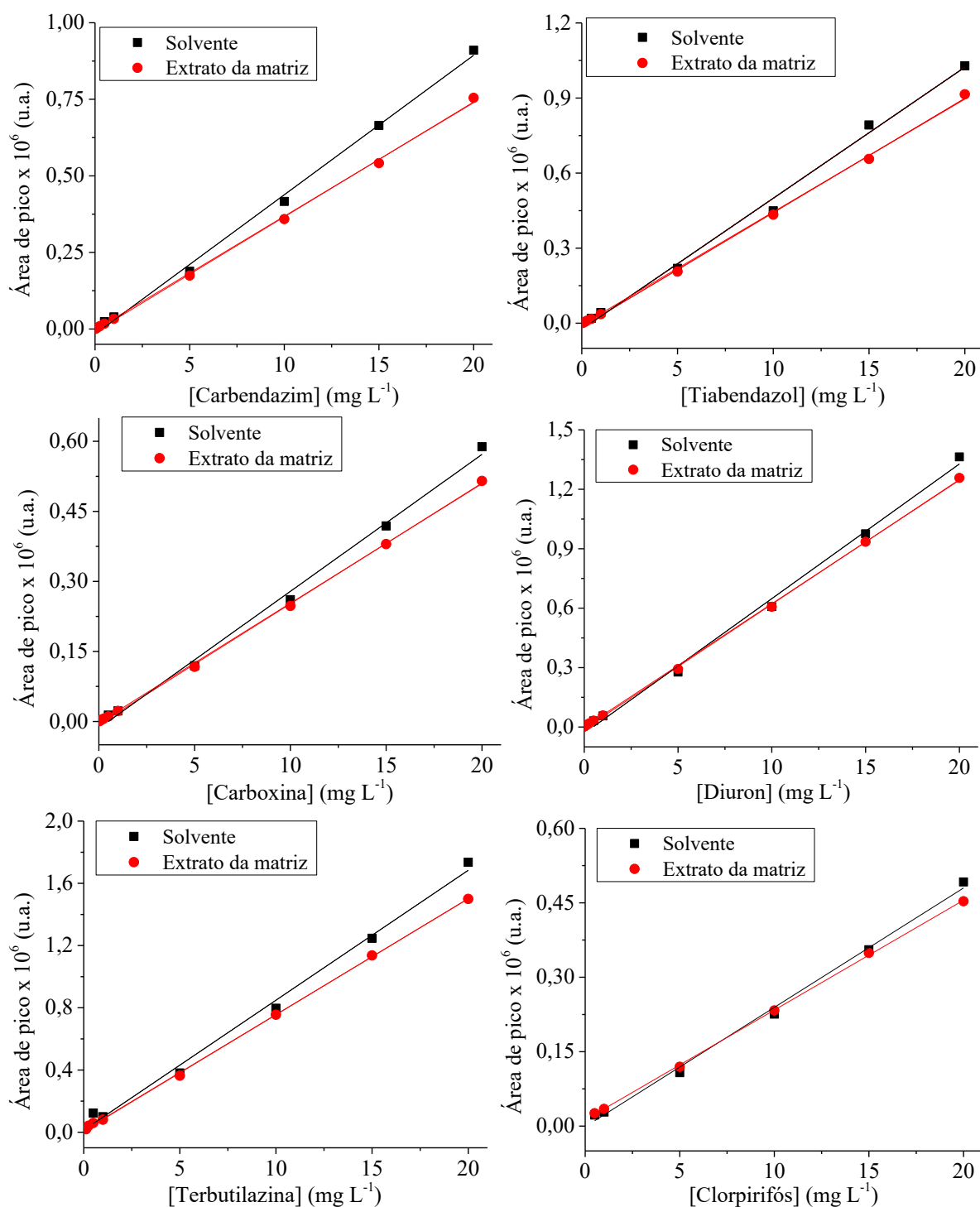
Fatores estudados		Níveis otimizados
A	Solvente	Acetato de etila
B	Volume de solvente	7,2 mL
C	Tempo de congelamento	3 h
D	Massa de amostra	0,5000 g
E	Volume de água	3,4 mL
F	Centrifugação	Não
G	Agitação	Vórtex
H	Tempo de contato	15 min

Fonte: próprio autor.

4.3 Validação de alguns parâmetros analíticos da metodologia desenvolvida

A metodologia de determinação de agrotóxicos em polpa de pequi foi validada quanto a alguns parâmetros analíticos para avaliação de seu desempenho e eficiência. Inicialmente, foram avaliadas as figuras de mérito associadas às curvas analíticas construídas para a quantificação dos resíduos dos agrotóxicos: a faixa de trabalho, a linearidade, a sensibilidade e o efeito matriz foram determinados neste estudo. A Figura 11 apresenta as curvas analíticas para os agrotóxicos preparadas em metanol e no extrato da matriz de polpa de pequi.

Figura 11 – Curvas analíticas para os agrotóxicos estudados.



Fonte: próprio autor.

Os dados das curvas analíticas, preparadas em solvente ou no extrato da matriz de polpa de pequi, obtidos a partir das regressões lineares da relação entre a concentração dos agrotóxicos e a área de pico nos comprimentos de onda apropriados para cada agrotóxico são apresentados na Tabela 15.

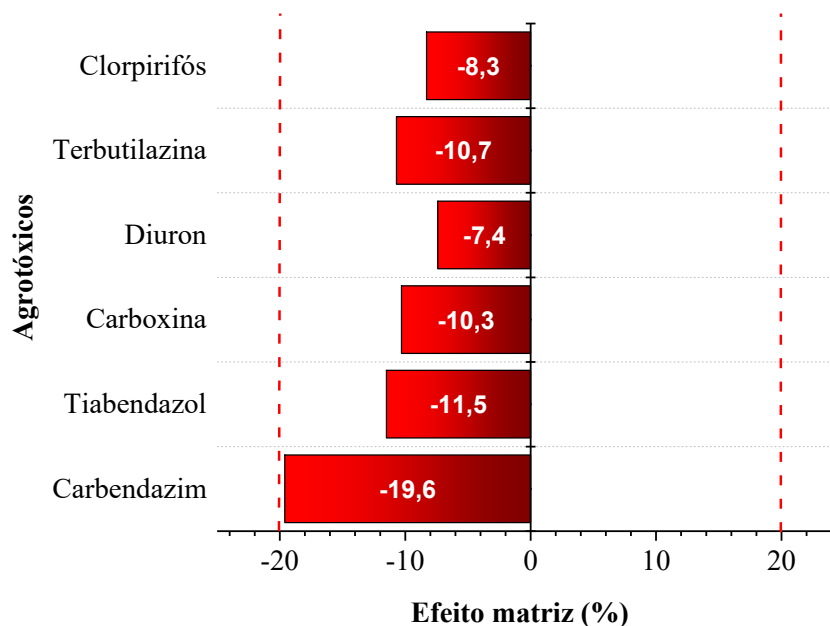
Tabela 15 – Equações de retas e coeficientes de correlação lineares das curvas analíticas para os agrotóxicos estudados preparados em solvente e no extrato da polpa de pequi.

Agrotóxico	Curva analítica em MeOH		Curva analítica no extrato	
	Equação de reta	r	Equação de reta	r
Carbendazim	$A = 0,046 \times C_{\text{Car}} - 0,017$	0,9987	$A = 0,037 \times C_{\text{Car}} - 0,003$	0,9996
Tiabendazol	$A = 0,052 \times C_{\text{Tia}} - 0,024$	0,9974	$A = 0,045 \times C_{\text{Tia}} - 0,006$	0,9995
Carboxina	$A = 0,029 \times C_{\text{Carb}} - 0,015$	0,9981	$A = 0,026 \times C_{\text{Carb}} - 0,003$	0,9997
Diuron	$A = 0,068 \times C_{\text{Diu}} - 0,032$	0,9982	$A = 0,062 \times C_{\text{Diu}} - 0,001$	0,9998
Terbutilazina	$A = 0,084 \times C_{\text{Terb}} + 0,014$	0,9970	$A = 0,074 \times C_{\text{Terb}} + 0,012$	0,9998
Clorpirifós	$A = 0,024 \times C_{\text{Clo}} - 0,001$	0,9982	$A = 0,022 \times C_{\text{Clo}} - 0,013$	0,9999

Fonte: próprio autor.

A ANVISA, regulamenta que, para a validação de métodos analíticos, a linearidade da curva analítica deve ser igual ou superior a 0,99 medida pelo coeficiente de correlação linear (r), e as curvas devem ser construídas com um mínimo de 5 diferentes concentrações (ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). Portanto, as linearidades de todas curvas analíticas construídas, seja no metanol ou no extrato da polpa de pequi, e o número de concentrações atendem a regulamentação da ANVISA. Além disso, pode-se observar que o modelo linear de regressão foi melhor ajustado quando as curvas analíticas foram preparadas no extrato da matriz de polpa de pequi. Este resultado se deve a compensação de efeitos de interação que ocorrem entre os compostos e componentes da matriz. Por este motivo, todas as calibrações realizadas no trabalho empregaram a curva analítica preparada no extrato da matriz de polpa de pequi. A construção das curvas analíticas no extrato da matriz e no solvente permitiu a determinação da porcentagem do efeito matriz de acordo com a Equação 4 (pág. 32) (Figura 12).

Figura 12 – Porcentagem do efeito matriz na extração de agrotóxicos da polpa de pequi, pelo método ESL-PBT.



Fonte: próprio autor.

Para todos os agrotóxicos foi observada uma pequena supressão na intensidade do sinal, com redução na inclinação da reta (sensibilidade analítica), com efeito matriz calculado inferior a 20 %, podendo ser considerado de baixa influência na resposta (CABRERA, 2012; SANTE, 2018; PINHO, *et al.*, 2009). Valores de efeito da matriz de 80-120 % são considerados valores adequados, indicando pouca influência dos componentes da matriz nos sinais analíticos. O intervalo é considerado aceitável para análise de resíduos de agrotóxicos em matrizes complexas, como é o fruto do pequi. Frequentemente, essa faixa de 100 ± 20 % é usada como valor de corte para justificar o uso de calibração de solvente, em oposição aos padrões correspondentes à matriz (HAJSLOVÁ; ZROSTLÍKOVÁ, 2003). Apesar da supressão do sinal, a preparação das curvas analíticas na matriz reduz o efeito matriz na quantificação dos agrotóxicos e, desta forma, foi adotada neste trabalho.

O limite de quantificação (LOQ) do método foi obtido a partir da injeção consecutiva de soluções padrão dos agrotóxicos em concentrações decrescentes até que o sinal analítico para cada composto apresentasse a menor quantidade quantificável com repetibilidade da área de pico menor que 20 % (desvio padrão relativo), conforme preconiza o guia de validação de métodos analíticos da comunidade Europeia (SANTE, 2018). Os valores de LOQ para os agrotóxicos pela metodologia desenvolvida neste trabalho são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Parâmetros analíticos da metodologia de determinação de resíduos de agrotóxicos em polpa de pequi.

Agrotóxicos	Faixa de Trabalho (mg L⁻¹)	Linearidade (r)	Sensibilidade (L mg⁻¹)	%EM	LOQ (mg L⁻¹)
Carbendazim	0,016 – 20,0	0,9996	0,037	-19,6	0,016
Tiabendazol	0,031 – 20,0	0,9995	0,045	-11,5	0,031
Carboxina	0,031 – 20,0	0,9997	0,026	-10,3	0,031
Diuron	0,008 – 20,0	0,9998	0,062	-7,4	0,008
Terbutilazina	0,125 – 20,0	0,9998	0,074	-10,7	0,125
Clorpirifós	0,500 – 20,0	0,9999	0,022	-8,3	0,500

Fonte: próprio autor.

O método apresentou maior sensibilidade para a terbutilazina comparada aos demais agrotóxicos, enquanto a menor sensibilidade foi registrada para o clorpirifós pelo método ESL-PBT. A princípio, a faixa de trabalho, que se refere ao intervalo de concentrações dos agrotóxicos a serem determinadas no fruto, foi mantida em uma ampla faixa de concentrações por não haver uma previsão das concentrações dos resíduos dos agrotóxicos a serem encontradas no pequi. Assim a faixa de trabalho apresenta entre seu limite inferior e limite superior até 3 ordens de grandeza de concentrações. Outro parâmetro avaliado no método foi o limite de quantificação (LOQ). De forma geral, os limites de quantificação para todos os agrotóxicos foram baixos, na faixa de 0,008 a 0,500 mg L⁻¹, indicando uma alta detectabilidade para o método, o que pode ser comprovado quando se comparada com os LOQ obtidos para os mesmos agrotóxicos porém empregando outros métodos de extração em alimentos (Tabela 17).

Tabela 17 – Comparação dos LOQ (mg L^{-1}) nesse trabalho com os encontrados na literatura, e LMR (mg kg^{-1}) definidos pela ANVISA.

Agrotóxicos	*LOQ	**LOQ Literatura	***LMR Algodão	***LMR Milho	***LMR Cana de Açúcar	***LMR Soja
Carbendazim	0,016	0,120 e 0,074	0,100	0,050	-	0,500
Tiabendazol	0,031	0,015	-	0,200	0,010	0,100
Carboxina	0,031	0,070	0,200	0,050	-	0,200
Diuron	0,008	10,000	0,100	0,050	0,100	0,200
Terbutilazina	0,125	0,180	-	0,100	-	-
Clorpirifós	0,500	1,330 e 6,754	0,500	0,100	-	0,010

Fonte: *LOQ: Própria; **LOQ Literatura: Carbendazim (CHOI, et al., 2007; FALQUI-CAO, et al., 2001), Tiabendazol (SILVA, 2015), Carboxina (MALDANER; SANTANA; JARDIM, 2008), Diuron (SOARES, 2014), Terbutilazina (TUZIMSKI; REJCZAK, 2016), Clorpirifós (HARSHIT; CHARMY; NRUPESH, 2017; ZALAT, et al., 2014); ***LMR: (ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2019).

A Tabela 17 apresenta os valores de LOQ obtidos por outros métodos de extração dos agrotóxicos, estudados neste trabalho, de amostras de alimentos como morango, óleos comestíveis, ginseng etc. A comparação dos LOQ do método proposto com métodos empregando outras matrizes alimentícias se deve à inexistência de trabalhos na literatura consultada sobre processos de extração de resíduos de agrotóxicos no pequi. Porém, os métodos já desenvolvidos para a determinação desses agrotóxicos em outros alimentos permitem avaliar a potencialidade de aplicação para a polpa de pequi.

O agrotóxico que apresentou maior LOQ nesse trabalho foi o Clorpirifós, no entanto, abaixo do registrado por outros métodos para determinação de seus resíduos em alimentos. O pico do Clorpirifós no cromatograma ficou em uma região contendo outros compostos eluídos, provavelmente provenientes de coextrativos hidrofóbicos da polpa de pequi, que foram removidos da coluna com o aumento da proporção de solvente orgânico na fase móvel, promovido para eluir mais rapidamente o clorpirifós, composto mais hidrofóbico da mistura de agrotóxicos. Esta turbulência no cromatograma foi registrada no intervalo entre 10,0 e 12,0 min, região de eluição do pico do clorpirifós. Além disso, o clorpirifós apresentou a menor intensidade de pico, mesmo no comprimento de máxima absorção, dentre os agrotóxicos, o que

justifica seu maior valor de LOQ. Para os demais agrotóxicos, os limites de quantificação encontrados na literatura foram, pelo menos, próximos aos obtidos neste trabalho, comprovando a boa detectabilidade do método proposto.

Comparando os valores de LOQ do método para os agrotóxicos com os limites máximos residuais para cada composto nas culturas em que são normalmente aplicados, Tabela 4 (pág. 17), observa-se que, com exceção do Clorpirifós, os agrotóxicos apresentaram menores valores de LOQ que os LMR disponíveis para as monoculturas apresentadas, se mostrando portanto um método útil para determinação de resíduos de agrotóxicos em polpa de pequi.

Valores de LOQ podem ser obtidos na literatura para métodos envolvendo detecção por espectrometria de massas. Geralmente, estes trabalhos apresentam resultados de LOQ em ordem de grandeza de $\mu\text{g kg}^{-1}$ (GRANDE-MARTÍNEZ, *et al.*, 2016), cerca de 10 a 1000 vezes menores dos obtidos neste trabalho. Porém, os dados neste trabalho comprovam que já são suficientes para monitorar estes agrotóxicos pelo método proposto, de acordo com as comparações realizadas.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi desenvolvido e otimizado um método de extração (ESL-PBT) de resíduos de agrotóxicos em polpa de pequi, com análise por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção UV por arranjo de diodos, que mostrou boa eficiência na recuperação dos agrotóxicos e detectabilidade adequada para a determinação de resíduos dos agrotóxicos carbendazim, clorpirifós, terbutilazina, tiabendazol, diuron e carboxina. O uso do PFF e do PCC proporcionaram boa eficácia no desenvolvimento e otimização do método, resultando em bons percentuais de recuperação para todas extrações realizadas no PCC, possibilitando a otimização das 8 variáveis estudadas, com rendimentos percentuais de recuperação próximos de 100 %. A avaliação visual do extrato obtido mostra que a solução, apesar de possuir coloração amarela resultante da extração de componentes do pequi juntos aos analitos, possui aspecto translúcido e livre de impurezas, o que elimina uma etapa adicional de purificação do extrato, simplifica a preparação da amostra, e reforça a eficácia do método otimizado, confirmada pelo baixo efeito matriz.

As figuras de método avaliadas, como o LOQ, linearidade, sensibilidade e efeito matriz mostraram que o método proposto é adequado para a finalidade desejada, atendendo os critérios de aceitação de agências regulamentadoras nacionais e internacionais. Apesar do detector não apresentar níveis de detectabilidade na mesma ordem de grandeza da espectrometria de massas, o detector por arranjo de diodos (UV-VIS) possibilitou valores de LOQ, no mínimo comparáveis a outros métodos disponíveis na literatura e aos LMR determinados pela ANVISA, adequadas para o monitoramento da contaminação de frutos do pequi expostos a cargas de agrotóxicos aplicados nas regiões de cultivo de grãos e cana-de-açúcar do Cerrado Brasileiro.

6 PRÓXIMAS ETAPAS

Este trabalho visou apenas o desenvolvimento e otimização do método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura de resíduos de agrotóxicos em polpa de pequi, com análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos (UV-VIS). As figuras de mérito avaliadas foram necessárias para desenvolvimento e otimização do método, e por este motivo, não foi realizada a avaliação das demais figuras de mérito, necessárias para a completa validação do método proposto.

Por este motivo, também não foi realizada a aplicação do método proposto, com a avaliação de frutos disponíveis no mercado quanto a resíduos dos agrotóxicos estudados.

Assim, as próximas etapas deste trabalho serão a validação completa do método analítico proposto, aplicação em frutos da região, e disponibilização dos resultados na literatura, para que no futuro, este fruto possa ser monitorado pela ANVISA, a fim de garantir a segurança alimentar dos consumidores do pequi.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A-A KHAMMAS, Z.; AHMAD, S. S. Cloud Point Extraction of Carbendazim Pesticide in Foods and Environmental Matrices Prior to Visible Spectrophotometric Determination. **Science Journal of Analytical Chemistry**, v. 4, n. 3, p. 30-41, 2016.

AKRAM, S. et al. Simultaneous determination of pesticide residues and antioxidants in blended oil using a liquid-liquid extraction combined with dispersive solid phase extraction method. **Separation Science and Technology**, v. 53, n. 10, p. 1563-1571, December 2017.

AKRAM, S. et al. Salting-out-assisted liquid-liquid extraction and reverse-phase high-performance liquid chromatographic monitoring of thiacloprid in fruits and vegetables. **Separation Science and Technology**, v. 53, n. 10, p. 1563-1571, 2018.

ALVES FILHO, J. P. **Uso de Agrotóxicos no Brasil - controle social e interesses corporativos**. São Paulo: Annablume, 2002. p. 23-29.

ALVES, A. M. et al. Características físicas e nutricionais de pequis oriundos dos estados de Tocantins, Goiás e Minas Gerais. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, 17, n. 3, 2014. p. 198-203.

ANASTASSIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **J. AOAC Int**, v. 83, p. 412, 2003.

ANJOS, J. R. N.; CHANCHAR, M. J. A.; AKIMOTO, A. K. Ocorrência de Antracnose Causada por *Colletotrichum acutatum* em Pequizeiro no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, 27, n. 1, 2002. p. 96-98.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003**, 2003.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**, 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>>. Acesso em: 26 Setembro 2019.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Monografias Autorizadas**, 2019. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>>. Acesso em: 26 Setembro 2019.

ARES, A. M. et al. Determination of flubendiamide in honey at trace levels by using solid phase extraction and liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 232, p. 169-176, October 2017.

BARRETO, A. S. et al. Characterization and application of a lanthanide-based metal-organic framework in the development and validation of a matrix solid-phase dispersion procedure for pesticide extraction on peppers (*Capsicum annuum* L.) with gas chromatography-MS. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 7, p. 1593-1599, December 2017.

BARROS NETO, B.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. 1. ed. Porto Alegre: Bookman Companhia Ed, 2010. p. 414.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A Química dos Agrotóxicos. **Química nova na Escola**, 34, n. 1, Fevereiro 2012. p. 10-15.

CABRERA, L. D. C. **Estudo do Efeito Matriz na Determinação de Agrotóxicos em Diferentes Tipos de Arroz pelo Método QuEChERS Modificado e LC-MS/MS**. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, p. 51-64, 104. 2012.

CALDAS, E. D. **Pesticide Poisoning in Brazil**. University of Brasilia. Brasilia. 2016.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G. Principais Técnicas De Preparo De Amostra Para A Determinação De Resíduos De Agrotóxicos Em Água Por Cromatografia Líquida Com Detecção Por Arranjo De Diodos E Por Espectrometria De Massas. **Química Nova**, 34, n. 9, 2011. 1604-1617.

CHOI, J.-H. et al. The Assessment of Carbendazim, Cyazofamid, Diethofencarb and Pyrimethanil Residue Levels in *P. ginseng* (C. A. Meyer) by HPLC. **Bull. Korean Chem. Soc.**, 28, n. 3, 2007. p. 369-372.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. [S.l.]: Editora da Unicamp, 2006.

CORDEIRO, M. W. S. et al. Características Físicas, Composição Químico-Nutricional e dos Óleos Essenciais da Polpa de Caryocar Brasiliense Nativo do Estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, 35, n. 4, 2013. p. 1127-1139.

COSTA, A. I. G. et al. Determination of pesticides in lettuce using solid–liquid extraction with low temperature partitioning. **Food Chemistry**, v. 181, p. 64-71, 2015.

DUARTE, J. D. S.; DORES, E. F. G. D. C.; VILLA, R. D. Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por vortex e ultrassom aplicada à determinação de agrotóxicos triazinas, triazinonas e o triazol flutriafol em água. **Química Nova**, v. 39, n. 8, p. 925-931, 2016.

FALQUI-CAO, C. et al. Focused Microwave Assistance for Extracting Some Pesticide Residues from Strawberries into Water before Their Determination by SPME/HPLC/DAD. **Food Chemistry**, 49, 2001. p. 5092-5097.

FANG, Y. et al. Simultaneous determination of pesticide residues and antioxidants in blended oil using a liquid-liquid extraction combined with dispersive solid phase extraction method. **Food Chemistry**, v. 229, p. 347-353, 2017.

FREITAS, B. M. C. A Política Nacional de Irrigação e o Uso de Agrotóxicos no Brasil: Contaminação e Intoxicações no Ceará. **GEOgraphia**, v. 20, n. 43, p. 86-100, 2018.

FREITAS, S. S.; SERAFIM, F. A. T.; LANÇAS, F. M. Determination of Target Pesticide Residues in Tropical Fruits Employing Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD) Extraction Followed by High Resolution Gas Chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 29, n. 5, May 2018. p. 1140-1148.

GIROUD, B. et al. Trace-level determination of two neonicotinoid insecticide residues in honey bee royal jelly using ultra-sound assisted salting-out liquid liquid extraction followed by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 151, December 2019.

GOULART, S. M. **Avaliação da Técnica de Extração com Partição em Baixa Temperatura na Análise de Carbamatos em Alimentos e Bebidas**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, p. 8-30. 2010.

GOULART, S. M. et al. Avaliação da ESL-PBT na determinação de carbaril em amostras de abacaxi pérola (Ananás comosus) comercializadas no município de Itumbiara. **Tecno-Lógica**, Santa Cruz do Sul, v. 23, n. 2, p. 100-107, Dezembro 2019.

GRANDE-MARTÍNEZ, Á. et al. Optimization and Validation of a Multiresidue Pesticide Method in Rice and Wheat Flour by Modified QuEChERS and GC–MS/MS. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 2, p. 548–563, February 2016.

HAJSLOVÁ, J.; ZROSTLÍKOVÁ, J. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, 1000, 2003. p. 181-197.

HAO, L.; LI, H.; LIN, J.-M. Fractional factorial design based microwave-assisted extraction for the determination of organophosphorus and organochlorine residues in tobacco by using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 40, p. 542-549, 2017.

HARSHIT, D.; CHARMY, K.; NRUPESH, P. Organophosphorus Pesticides Determination by Novel HPLC and Spectrophotometric Method. **Food Chemistry**, 230, September 2017. p. 448-453.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. D. A.; QUEIROZ, S. C. D. N. Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos: Uma Preocupação Ambiental Global - Um Enfoque Às Maças. **Química NOva**, 32, n. 4, 2009. p. 996-1012.

KAIMAL, A. M. et al. Novel, energy efficient and green cloud point extraction: technology and applications in food processing. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 524–534, February 2019.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A Conservação do Cerrado Brasileiro. **Megadiversidade**, 1, n. 1, Julho 2005. p. 147-155.

LI, J. et al. Use of a Headspace Solid-Phase Microextraction-Based Methodology Followed by Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for Pesticide Multiresidue Determination in Teas. **Chromatographia**, v. 81, n. 5, p. 809–821, May 2018.

LUNDSTEDT, T. et al. Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 42, p. 3-40, 1998.

MALDANER, L.; SANTANA, C. C.; JARDIM, I. C. S. F. HPLC Determination of Pesticides in Soybeans using Matrix Solid Phase Dispersion. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, 31, n. 7, 2008. p. 972-983.

OLIVEIRA, M. E. B. D. et al. Aspectos Agronômicos e de Qualidade do Pequi. **Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, n. 1, p. 9, 2009.

PELAJIC, M. et al. Novel multiresidue method for determination of pesticides in red wine using gas chromatography–mass spectrometry and solid phase extraction. **Food Chemistry**, v. 200, p. 98-106, June 2016.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. **É Veneno ou Remédio? Agrotóxicos, Saúde e Ambiente**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 28-29, 157.

PINHO, G. P. et al. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, 32, 2009. p. 987-995.

PRESTES, O. D. et al. 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.

RAMOS, K. M. C.; SOUZA, V. A. B. D. Características Físicas e Químico-Nutricionais de Frutos de Pequizeiro (*Caryocar coriaceum* Wittm.) em Populações Naturais da Região Meio-Norte do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 500-508, Junho 2011.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, 27, 2004. p. 771-780.

RODRIGUES, R. P. et al. Otimização da Extração Sólido Líquido com Partição em Baixa Temperatura para Determinação de Carbofurano em Cucurbita pepo L ("Abobrinha") por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Química Nova**, 41, n. 2, 2018. p. 213-218.

SANTANA, E. T. D.; SOARES, D. F.; FARIA, A. M. Development of a Methodology for the Determination of Pesticide Residues in Cajá-Manga Pulp (*Spondias dulcis* L.) Using Solid-Liquid Extraction with Low-Temperature Partitioning. **Journal of Chemistry**, November 2018.

SANTE, E. C. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed, n. SANTE/11813/2017, 2018.

SANTOS, F. S. et al. A Cultura do Pequi. **Acta Iguazu**, Cascavel, v. 2, n. 3, p. 46-57, 2013.

SARMENTO, H. D. M. **Determinação de agrotóxicos em alfaces (*Lactuca sativa* L.) orgânicas comercializadas em feiras agroecológicas de João Pessoa-PB**. Universidade Federal da Paraíba. [S.l.], p. 15. 2016.

SILVA, É. A. S.; PAWLISZYN, J. Direct Immersion Solid-Phase Microextraction with Matrix-Compatible Fiber Coating for Multiresidue Pesticide Analysis of Grapes by Gas Chromatography–Time-of-Flight Mass Spectrometry (DI-SPME-GC-ToFMS). **Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 18, p. 4464-4477, April 2015.

SILVA, M. D. S. **Desenvolvimento e validação de um método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação simultânea de diferentes antiparasitários em suas formulações farmacêuticas veterinárias.** Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, p. 52. 2015.

SKOOG, A. D. et al. **Fundamentos de Química Analítica.** São Paulo: Cengage Learning, v. 8, 2008. p. 862-863.

SOARES, D. F. **Validação de metodologias de extração e quantificação de pesticidas diuron, clorpirifós e metil paration em águas subterrâneas em região de cultura de soja, utilizando QuEChERS/HPLC-UV.** Araraquara, p. 81. 2014. (Universidade Estadual Paulista).

SOARES, W. L.; PORTO, M. F. Atividade agrícola e externalidade ambiental: uma análise a partir do uso de agrotóxicos no cerrado brasileiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, 12, n. 1, 2007. p. 131-143.

SOARES, W. L.; PORTO, M. F. D. S. Uso de Agrotóxicos e Impactos Econômicos Sobre a Saúde. **Revista Saúde Pública**, 46, n. 2, 2012. p. 209-217.

TIRYAKI, O. Validation of QuEChERS method for the determination of some pesticide residues in two apple varieties. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 51, n. 10, June 2016.

TUZIMSKI, T.; REJCZAK, T. Application of HPLC–DAD after SPE/QuEChERS with ZrO₂-based sorbent in d-SPE clean-up step for pesticide analysis in edible oils. **Food Chemistry**, 190, 2016. p. 71-79.

U.S. National Library of Medicine. **PubChem**, 2019. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 16 out. 2019.

VENKATARAMAN, S.; CHADHA, A. Preparation of enantiomerically enriched (S)-ethyl 3-hydroxy 4,4,4-trifluorobutanoate using whole cells of *Candida parapsilosis* ATCC 7330. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 169, p. 66-71, 2015.

ZALAT, O. A. et al. Validation of UV Spectrophotometric and HPLC Methods for Quantitative determination of chlorpyrifos. **International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy**, v. 2, p. 58-63, 2014.