

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Emprego da extração sólido-líquido por partição à baixa temperatura para
extração de propoxur de amostras de carne bovina

Karoline Rayzel Rodrigues de Campos

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2021

Karoline Rayzel Rodrigues de Campos
Tecnóloga em Tecnologia de Alimentos

**Emprego da extração sólido-líquido por partição à baixa temperatura para extração de
propoxur de amostras de carne bovina**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:

Profa. Dra. **WANEISSA MELCHERT MATTOS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Campos, Karoline Rayzel Rodrigues

Emprego da extração sólido-líquido por partição à baixa temperatura para extração de propoxur de amostras de carne bovina / Karoline Rayzel Rodrigues de Campos. -- versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. -- Piracicaba, 2021.

52 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Propoxur 2. Química verde 3. Extração sólido líquido 4. Carne bovina
5. Imagens digitais I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao amor da minha vida, que sempre acreditou que eu poderia ser uma pessoa melhor.
Se hoje sou quem sou, é graças a ele, amado marido, companheiro pra vida, obrigada por tudo Thales A. V. de Campos.
Aos meus pais, Luiz e Lourdes, graças a seus erros e acertos que cheguei onde estou, nunca deixaram de acreditar em mim.

EPÍGRAFE

“O milagre não prova o impossível; serve, apenas, como confirmação do que é possível.”

Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me ouvir nos momentos de necessidade e por me orientar.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Wanessa M. Mattos por toda paciência durante esses dois anos, assim como toda sabedoria transmitida, pelos ensinamentos, conselhos e inspirações, por ter acreditado em mim em todos os momentos. Serei eternamente grata por este tempo que trabalhamos juntas, minha eterna admiração.

Aos colegas do GEQAV, pelo tempo que passamos juntos.

À técnica Rita de Castro, por todo ensinamento, paciência, carinho, conversas e ajuda.

Às amigas que cultivei nesses dois anos e que levarei para vida. Juliana, amizade que veio da graduação para a pós, obrigada pela amizade, pelos conselhos e por toda a ajuda.

A todos do departamento de ciências exatas área da química com quem convivi diariamente, seja tomando um café ou conversando durante o almoço, muito obrigada, vocês são ótimos!

À CAPES pela bolsa concedida e à FEALQ pelo auxílio financeiro.

À USP e ao Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos da ESALQ pela oportunidade da pós-graduação.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
1. Introdução	11
1.1. PESTICIDAS	11
1.2. CARNE BOVINA	15
1.3. PREPARO DA AMOSTRA	15
1.3.1. <i>Extração em fase sólida</i>	16
1.3.2. <i>Microextração em fase sólida</i>	17
1.3.3. <i>Extração por fluido supercrítico</i>	18
1.3.4. <i>Extração por líquido pressurizado</i>	19
1.3.5. <i>Extração assistida por microondas</i>	20
1.3.6. <i>Extração por QuEChERS</i>	20
1.3.7. <i>Extração sólido-líquido por partição à baixa temperatura</i>	21
1.4. QUÍMICA VERDE	22
1.5. IMAGENS DIGITAIS	24
2. MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.1. EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	28
2.2. REAGENTES E SOLUÇÕES	29
2.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	30
3. Resultados e discussão	31
3.1. PROCEDIMENTO DE FORTIFICAÇÃO E HOMOGENEIZAÇÃO DA AMOSTRA	31
3.2. PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DO PROPOXUR	33
3.2.1. <i>Otimização da massa de amostra</i>	33
3.2.2. <i>Otimização do volume de solução de fortificação</i>	33
3.2.3. <i>Otimização do solvente extrator</i>	34
3.2.4. <i>Otimização do tempo de agitação</i>	35
3.2.5. <i>Otimização do tempo de centrifugação</i>	36
3.2.6. <i>Otimização do tempo de congelamento</i>	37
3.3. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	39
3.4. ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE CARNE BOVINA	41
4. Conclusão	43
Referências	44

RESUMO

Emprego da extração sólido-líquido por partição à baixa temperatura para extração de propoxur de amostras de carne bovina

Propoxur é um pesticida empregado no controle de pragas como carrapatos, pulgas, baratas e vários outros insetos, sendo permitido, de acordo com órgãos regulamentadores, a concentração de até $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ em amostras de carne bovina. Dentre os procedimentos relatados na literatura utilizando preparo de amostras para determinação de propoxur, estão a extração líquido-líquido convencional, extração por fluido supercrítico, extração em fase sólida e QuEChERS, extrações estas que apresentam como característica comum o emprego de elevados volumes de solventes orgânicos. Neste contexto, foi desenvolvido um procedimento de extração limpo para determinação de propoxur em carne bovina. O procedimento experimental otimizado consistiu da pesagem de 0,25 g de amostra, previamente moída, de carne fortificada, adição de 1 mL de metanol em tubo tipo Eppendorf®, agitação por 10 min a 200 rpm, centrifugação por 20 min a 2000 rpm e refrigeração a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ por 60 min. Em seguida, a fase orgânica foi vertida para outro tubo tipo Eppendorf®, ao qual reagentes apropriados foram adicionados para formação do azul de indofenol, e a determinação por imagens digitais foi realizada *in situ*. A resposta linear foi obtida para o intervalo de $3,0 \times 10^{-5}$ a $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de propoxur, descrita pela equação Sinal Analítico = $73 + 103 \times 10^3 C$ (mol L^{-1}), $R = 0,999$. Os limites de detecção e quantificação foram estimados em $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, coeficiente de variação ($n = 11$) foi estimado em 0,66%. Estudos de adição e recuperação de propoxur em amostras de carne bovina foram realizados obtendo porcentagem de recuperação entre 100 e 128%. O procedimento analítico desenvolvido é uma alternativa de preparo de amostra limpo, empregando baixos volumes de solvente orgânico e atendendo aos preceitos da química verde.

Palavras-chave: Propoxur, Química verde, Extração sólido líquido, Carne bovina, Imagens digitais

ABSTRACT

Use of solid-liquid extraction with low temperature partitioning for extraction of propoxur in meat samples

Propoxur is a pesticide used to control pests such as ticks, fleas, cockroaches and various other insects, being allowed, according to regulatory agencies, the concentration of up to $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ in meat samples. Among the reported procedures in literature for sample preparation aiming propoxur determination, the conventional liquid-liquid extractions, supercritical fluid extraction, solid-phase extraction and QuEChERS, extractions which have as a common feature the use of high volumes of organic solvents. In this context, a clean extraction procedure was developed to determine propoxur in meat. The optimized experimental procedure consisted of weighing 0.25 g of sample, previously minced, of fortified meat, 1 mL of methanol, were added in an Eppendorf® type tube, stirred for 10 min at 200 rpm, centrifuged for 20 min at 2000 rpm and refrigerated at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ for 60 min. Then, the organic phase was poured into another Eppendorf® tube, where appropriate reagents were added for indophenol blue formation, and the determination by digital image was performed in situ. Linear response was obtained between 3.0×10^{-5} to $8.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ of propoxur, described by the equation Analytical Signal = $73 + 103 \times 10^3 C$ (mol L^{-1}), $R = 0.999$. Limits of detection and quantification were estimated as $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, coefficient of variation ($n = 11$) was estimated as 0.66%. Studies of addition and recovery of propoxur in beef samples were performed obtaining a recovery percentage between 100 and 128%. The analytical procedure developed is an alternative for clean sample preparation, using low volumes of organic solvent and complying with the precepts of green chemistry.

Keywords: Propoxur, Green chemistry, Solid liquid extraction, Meat, Digital images

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Consumo anual de pesticidas por país (2017).....	12
Figura 2. Estruturas químicas do ácido N-metilcarbâmico (a) e do propoxur (b).....	14
Figura 3. Etapas da extração em fase sólida.....	16
Figura 4. Microextração em fase sólida do modo (A) direto; (B) <i>headspace</i> e (C) protegido por membrana	17
Figura 5. Processo de extração com fluído supercrítico.....	18
Figura 6. Fluxograma do método QuEChERS	21
Figura 7. Os “12 princípios da química verde” propostos por Anastas e Eghbali (1998).....	24
Figura 8. Representação de imagens digitais por matrizes de pontos discretos em uma grade retangular (a) 2D e (b) 3D	25
Figura 9. Esquema do cubo de cores RGB.....	26
Figura 10. Esquema de montagem para obtenção das imagens digitais. (a) caixa de isopor; (b) caixa auxiliar e (c) lâmpada de LED	28
Figura 11. Obtenção da imagem digital com auxílio do aplicativo de acesso gratuito ColorGrab®.....	29
Figura 12. Procedimento experimental.....	30
Figura 13. Esquema das reações envolvidas na formação do azul de indofenol a partir do propoxur	31
Figura 14. Efeito do tempo da agitação sob o sinal de reflectância do propoxur $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (a) e do branco analítico (b).	36
Figura 15. Efeito do tempo da centrifugação sob o sinal de reflectância do propoxur $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (a) e do branco analítico (b).....	37
Figura 16. Efeito do tempo de congelamento sob o sinal de reflectância do propoxur $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (a) e do branco analítico (b).....	38
Figura 17. Foto da SLE-LTP na extração do propoxur da carne bovina, após parâmetros otimizados.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagens de recuperação de propoxur (n = 3) obtidas empregando maneiras diferentes de fortificação e homogeneização	32
Tabela 2. Porcentagens de recuperação de propoxur $8,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ (n = 3) obtidas empregando diferentes massas de amostras de carne bovina	33
Tabela 3. Porcentagem de recuperação de propoxur $8,0 \times 10^{-4}$ (n = 3) obtidas empregando diferentes volumes de solução de fortificação	34
Tabela 4. Porcentagens de recuperação de propoxur $8,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ (n = 3) obtidas empregando solventes extratores	34
Tabela 5. Porcentagens de recuperação de propoxur $8,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ (n = 3) obtidas empregando diferentes volumes de solvente extrator	35
Tabela 6. Parâmetros otimizados da SLE-LTP para extração de propoxur da carne bovina....	38
Tabela 7. Características analíticas do procedimento desenvolvido.....	39
Tabela 8. Metodologias utilizadas para análise de propoxur em alimentos e bebidas.....	41
Tabela 9. Estudo de adição e recuperação do propoxur em amostras de carne bovina (n = 3)	42

1. INTRODUÇÃO

1.1. Pesticidas

Com o crescente aumento da população e a consequente necessidade de incrementar a produção de alimentos, os pesticidas têm sido utilizados visando combater doenças fitossanitárias, pragas e ervas daninhas que atacam as culturas, bem como os alimentos armazenados (BARRETO *et al.*, 1996). Em países de clima quente, cereais e grãos armazenados ficam susceptível a infestação de insetos e fungos que, devido às condições climáticas, se desenvolvem rapidamente nesses alimentos, resultando em perdas da produção.

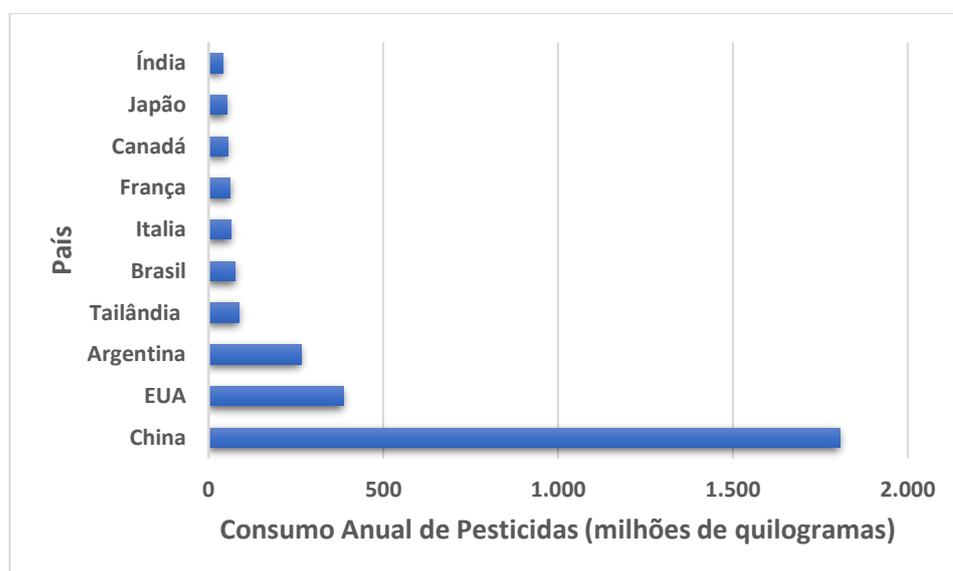
De acordo com os regulamentos da agência norte-americana de proteção ambiental (EPA, do inglês *Environmental Protection Agency*) os pesticidas são definidos como substância ou mistura de substâncias projetadas para prevenção, destruição ou redução de quaisquer organismos prejudiciais; para regular, desfolhar ou secar plantas; qualquer estabilizador de nitrogênio (substância cuja finalidade é reduzir as perdas de N, componente central dos aminoácidos, proteína e clorofila da planta). Os resíduos de pesticidas são definidos através da Portaria nº 03 de 16 de janeiro de 1992 (BRASIL, 1992) como:

Substância ou mistura de substâncias remanescente ou existente em alimentos ou no meio ambiente decorrente do uso ou da presença de pesticidas e afins, inclusive quaisquer derivados específicos, tais como produtos de conversão e de degradação, metabólitos, produtos de reação e impurezas, consideradas tóxicas e ambientalmente importantes.

Cerca de 2 milhões de toneladas de pesticidas são usados anualmente em todo o mundo, dos quais a China é a maior contribuinte, seguida de EUA, Argentina, Tailândia e Brasil, conforme mostrado na Figura 1. (SHARMA *et al.*, 2019, PARIONA, 2017). A China é o país mais populoso do mundo que leva a alta demanda por alimentos, impulsionando a produção de cereais e, conseqüentemente, aumentando o emprego de pesticidas. (SHARMA *et al.*, 2019; ROSER, 2017). O emprego de pesticidas nas agriculturas dos EUA data desde o final dos anos 1800, mas o crescimento drástico ocorreu no final de 1940 até o início de 1980, estabilizando posteriormente. Tal crescimento foi impulsionado pelas culturas de soja e milho, tornando o país o maior produtor dos grãos do mundo (OSTEEN, 1993; ROSER, 2017). Classificada a partir da área cultivada, a Argentina é a décima nação agrícola do mundo (atrás dos Estados Unidos, Índia, Rússia, China, Brasil e Austrália), contando com 31 milhões de hectares dedicados à agricultura e respondendo por 2,2% da área total cultivada do mundo (GERÓNIMO *et al.*, 2014). O país é um dos quatro maiores produtores de soja, semente de girassol, milho e trigo do mundo. (DONGHI; CALVERT; EIDT, 2021; ROSER, 2017). A Tailândia é um país majoritariamente agrícola, com 39% da

população envolvida em atividade agrícola e 46,5% da área total de terras destinada para agricultura. Trata-se de um grande exportador mundial de arroz, ocupando posto de 6º lugar nas exportações, atrás apenas da China, Índia, Indonésia, Bangladesh e Vietnã. (FAO; SHAHBANDEH, 2021; ROSER, 2017). O Brasil faz uso de pesticidas desde a década de 50, momento em que houve aumento expressivo no emprego dos pesticidas para elevar a produtividade agrícola (FERREIRA *et al*, 2014). O país é importante produtor e exportador de diversas *commodities* agrícolas, sendo o segundo maior produtor mundial de soja. O emprego de pesticidas apresentou aumento expressivo paralelo com o aumento da produção de grãos (PAUMGARTTEN, 2020).

Figura 1. Consumo anual de pesticidas por país (2017).



Fonte: Adaptado de Pariona (2017)

Com a finalidade de alcançar o uso sustentável de agrotóxicos, fixaram-se Limites Máximos de Resíduos (LMR) em alimentos. Essas restrições limitam a concentração de resíduos permitidos em *commodities* alimentares e os tipos permitidos para uso.

As autoridades governamentais têm a responsabilidade de registrar, definir limites máximos e implementar planos de monitoramento de resíduos de pesticidas nos alimentos (PICÓ, 2016). Em 2001, foi criado o Plano de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), ação coordenada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), junto com as agências estaduais e municipais de inspeção sanitária e laboratórios estaduais de saúde pública. O plano tem como finalidade avaliar continuamente o nível de resíduos de pesticidas em alimentos de origem vegetal para garantir a segurança do consumidor. Desde a criação, o programa analisou mais de 35 mil amostras envolvendo 28 tipos de alimentos vegetais (ANVISA, 2020). O uso de pesticidas ainda é uma estratégia muito comum para o controle de pragas em ambientes agrícolas durante o

manejo pré e pós-colheita da cultura. A toxicidade desses componentes nem sempre é restrita a praga alvo, sendo também demonstrada em mamíferos e em humanos (BELPOGGI *et al.*, 2006).

O uso abusivo desses compostos vem se mostrando um problema crescente em diversos setores da cadeia alimentícia. Um dos pontos da cadeia que apresenta tal problema são os produtos pecuários. Resíduos de agrotóxicos presentes nas plantas podem alcançar os animais por meio de seu consumo ou através da pulverização, técnica utilizada para evitar infestação de pragas em animais e em suas acomodações. Tal comportamento pode levar à bioacumulação de pesticidas persistentes (como os organoclorados), em produtos de origem animal (como carnes, peixes, ovos, etc.) (KANG *et al.*, 2020). Tal fato já apresentou ocorrências práticas, como por exemplo na Califórnia em 2013, onde 159 vacas leiteiras alimentadas com ração mista, morreram por envenenamento pelo pesticida organofosforado forato. Esse composto foi encontrado em cascas de amêndoas, a quais foram incorporadas à ração animal.

Os organofosforados e os carbamatos, pesticidas não persistentes, são as classes mais empregadas no mundo. Por serem instáveis e de rápida degradação, acabaram substituindo outras classes importantes como os organoclorados, mas podem causar efeitos crônicos por ingestão ou inalação, como vômito, náuseas, perda de peso, dores de cabeças e baixos níveis de acetilcolinesterase (ASSIS, 2008; ZAFIROPOULOS *et al.*, 2014).

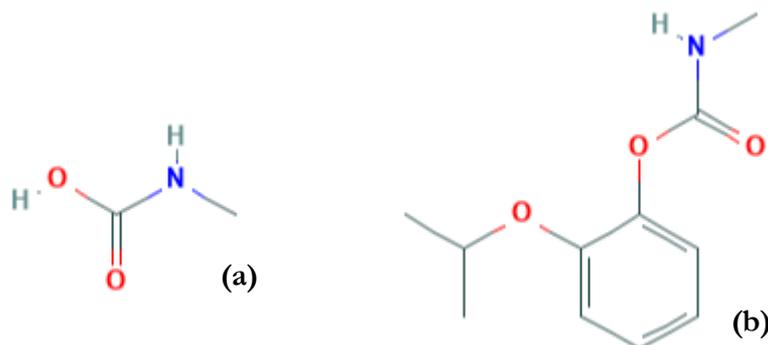
Os carbamatos são uma classe de pesticidas formados a partir da dissociação do ácido carbâmico (Figura 2a). Savoy (2011) define os pesticidas carbamatos como compostos que tenham em comum a estrutura geral (R-OCONH-CH) do ácido N-metilcarbâmico.

O processo de formação ocorre pelo ataque nucleofílico de amina não carregadas, tratando-se assim de uma reação exotérmica e reversível. Possuem estrutura simples quando comparado aos organofosforados, com mecanismo de ação variável, dependendo do tipo de pesticida, como por exemplo o propoxur e o carbaril, que possuem mecanismo de ação similar aos organofosforados, formando complexo menos estável com a colinesterase, permitindo uma recuperação enzimática mais rápida (BAROTTO, [S.D]). Os carbamatos mais usados mundialmente são o aldicarbe, aldicarbe sulfona, aldicarbe sulfóxido, carbaril, carbofuran, metomil, metiocarbe, oxamil, pirimicarbe e o propoxur (KUSSUMI, 2007).

Quando aplicados de forma indevida em lavouras, o resíduo dos pesticidas pode contaminar produtos agrícolas e cursos d'água. Os animais que entram em contato, de maneira direta ou indireta pela comida ou pela água podem se contaminar, ocorrendo acúmulo dos pesticidas nos músculos ou na gordura do animal, podendo também haver migração para o leite (NERO *et al.*, 2007).

O propoxur [2-(1-metiletoxi)fenol] metilcarbamato], Figura 2b, é um pesticida não sistêmico, proposto em 1959, amplamente utilizado comercialmente como Baygon® em residências como inseticida; Kiltix (Bayer®) em coleira de animais domésticos como carrapaticida e Cidental® em gados como larvicida e repelente de moscas em geral.

Figura 2. Estruturas químicas do ácido N-metilcarbâmico (a) e do propoxur (b)



Fonte: Pubchem, 2020

Esse composto é um contaminante aquático e de fontes alimentares devido à alta solubilidade em água ($1,75 \text{ g L}^{-1}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$) (FAO). O propoxur é classificado pela EPA (*Environmental Protection Agency*) como potencial carcinogênico e o efeito letal em humanos ocorre quando a acetilcolina permanece ativa na sinapse devido a inibição da atividade AChE (acetilcolinesterase) (COSTA, 2014).

O propoxur já foi utilizado para pulverização residual interna em programas de erradicação da malária. A técnica envolve a aplicação do pesticida em superfícies de repouso de potenciais transmissores da malária, como áreas internas de residências, prédios públicos ou habitações localizadas em áreas onde há risco de contato desses vetores. No entanto, o uso excessivo pode provocar em espécies não alvo, toxicidade aguda e crônica (CHOI; MCINTYRE; FURNIVAL-ADAMS, 2019). Embora o efeito benéfico do propoxur tenha aumentado a produtividade agrícola e a redução de doenças transmitidas por insetos, este pode vir a ser potencialmente perigoso para saúde humana (LIANG *et al.*, 2019).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece a Ingestão Diária Aceitável (IDA) de propoxur para humanos $0,02 \text{ mg/kg}$ e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabelece o limite máximo para carne bovina $0,05 \text{ mg/kg}$ (ANVISA; ANVISA, 2018).

1.2. Carne bovina

Como resultado de décadas de estudo e investimento em novas tecnologias, extensão territorial e clima favorável, o Brasil é hoje um dos mais importantes produtores de carne do mundo, com o segundo maior rebanho, atrás apenas da Índia (FGV).

Segundo dados publicados pela Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC), no ano de 2018, o Brasil contava com rebanho de 214,7 milhões de bovinos. Nesse mesmo ano, o país exportou 2,21 milhões de toneladas equivalente de carcaça, sendo 79,8% do produto *in natura*, 11,8% do produto processado e 8,4% de miúdos/outros.

Uma publicação conjunta da OECD (do inglês *Organisation for Economic Co-operation and Development*) e da FAO (do inglês *Food and Agriculture Organization*) forneceu perspectivas para o mercado de carnes nos próximos dez anos. O documento mostrou que até 2029 deverá haver aumento de 6 milhões de toneladas equivalente de carcaça, sendo que 4,86 milhões de toneladas (81%) deverá vir de países em desenvolvimento como a Argentina, Brasil, China, Paquistão, África Subsaariana e Turquia (OECD, 2020).

Dentre os alimentos, a carne bovina tem destaque pela alta qualidade proteica, assim como vitaminas do complexo B, ácidos graxos e também pelo alto teor de minerais como potássio, fósforo, magnésio, ferro e zinco (REIS, 2019).

Para garantir a qualidade da carne bovina, é preciso verificar toda a cadeia produtiva do produto, desde o nascimento do animal até o consumidor final. A qualidade deve ser o ponto principal na cadeia produtiva, com a finalidade de manter todas as características nutricionais e sensoriais do produto. Essa qualidade é avaliada segundo características químicas, físicas e microbiológicas (REIS, 2019).

Os sistemas de avaliação da carne, assim como dos alimentos de uma forma geral, são baseados em atributos como o aspecto visual do produto, a qualidade nutricional e aspectos gustativos da carne. Complementarmente, o produto deve ser isento de contaminantes como pesticidas e ser seguro em termos higiênico-sanitário (SARCINELLI *et al.*, 2007).

1.3. Preparo da amostra

Os riscos para a saúde humana provenientes do emprego de pesticidas em alimentos têm gerado esforços na busca de análises químicas confiáveis, rápidas, simples, de baixo custo e ambientalmente amigáveis.

A etapa de preparo de amostra é a etapa mais demorada da análise química, totalizando 61% do tempo analítico total. Além de demorada, é também a etapa com maior fonte de erros em

análises. Devido à baixa concentração do analito e matrizes complexas, um método adequado de preparo de amostras não apenas melhora a capacidade de concentração do analito, mas também impede possíveis interferentes que possam minimizar a seletividade e sensibilidade do método analítico (HOU *et al*, 2019).

Avanços significativos foram feitos na área de análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos para simplificar, minimizar e melhorar o processo de extração e purificação da amostra (KAIPPER, 1998). Esses avanços têm como objetivo substituir os métodos consolidados para análise de resíduos, os quais se caracterizam pela baixa frequência analítica, uso de grandes quantidades de solventes e custos elevados (PRESTES, 2011).

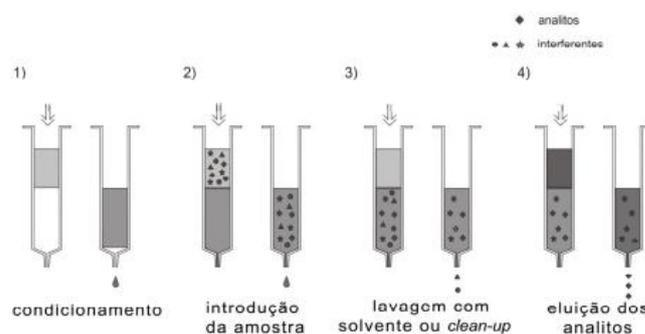
Dentro das metodologias que vêm sendo empregadas para extração de agrotóxicos em alimentos estão a Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*), Microextração em Fase Sólida (SPME, do inglês *Solid-Phase Microextraction*), Extração por Fluido Supercrítico (SFE, do inglês *Supercritical Fluid Extraction*), Extração por Líquido Pressurizado (PLE, do inglês *Pressurised Liquid Extraction*) e Extração Assistida por Microondas (MAE, do inglês *Microwave Assisted Extraction*) (FRIGGI, 2012).

1.3.1. Extração em fase sólida

Proposta em 1976 por Yoshimura e colaboradores com a finalidade de sanar as desvantagens apresentadas pelas extrações líquido-líquido, esse método tornou-se um dos mais empregados em preparo de amostras para diversos tipos de análises nas áreas farmacêutica, ambiental e de alimentos.

Segundo Jardim (2010), o procedimento da SPE é geralmente composto por quatro etapas: 1) ajuste do adsorvente com um solvente adequado; 2) introdução da amostra; 3) limpeza ou purificação com solvente e 4) eluição do analito (Figura 3).

Figura 3. Etapas da extração em fase sólida



Fonte: Jardim (2010)

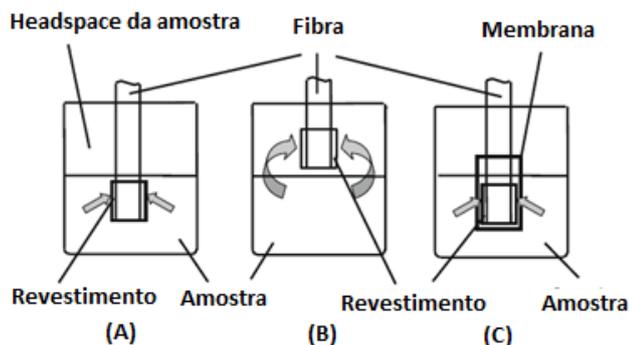
Quando comparada com a extração líquido-líquido clássica, as vantagens da SPE incluem baixo consumo de solventes, ausência da formação de emulsão, automação facilitada, altas taxas de recuperação do analito e baixos volumes de resíduos. Entretanto, esta também apresenta desvantagens, tais como o custo elevado dos cartuchos e dificuldade na seleção de adsorvente adequado. Além disso, como os cartuchos são fabricados para uso único, só é possível sua utilização uma única vez, fazendo com que a precisão dos resultados não seja tão satisfatória. (JARDIM, 2010; NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009).

1.3.2. Microextração em fase sólida

Proposta pelo professor Janusz Pawliszyn da Universidade de Waterloo em 1990, trata-se de uma extração que combina, em uma única etapa, a amostragem, o enriquecimento e a separação, tornando o preparo de amostra simples, rápido, eficiente e ambientalmente amigável (OUYANG; JIANG, 2017).

O procedimento mais usual empregando SPME envolve o emprego de uma pequena quantidade da fase extratora dispersa em suporte sólido exposto à amostra por tempo determinado. A adsorção do analito ocorre em sorvente imóvel sob fibras de sílica fundida. Geralmente, quando atinge o equilíbrio na amostra e no revestimento da fibra, o processo de microextração é então considerado completo. A Figura 4 demonstra a SPME no modo (A) direto (a fibra é inserida na amostra e o analito é transferido da matriz direto para o revestimento); (B) *headspace* (a extração ocorre com a introdução da fibra no headspace acima da matriz da amostra) e (C) protegido por membrana (a fibra é inserida em uma membrana imersa na amostra) (MARQUES, 2011; PAWLISZYN, 2012).

Figura 4. Microextração em fase sólida do modo (A) direto; (B) *headspace* e (C) protegido por membrana



Fonte: Adaptada de Pawliszyn (2012)

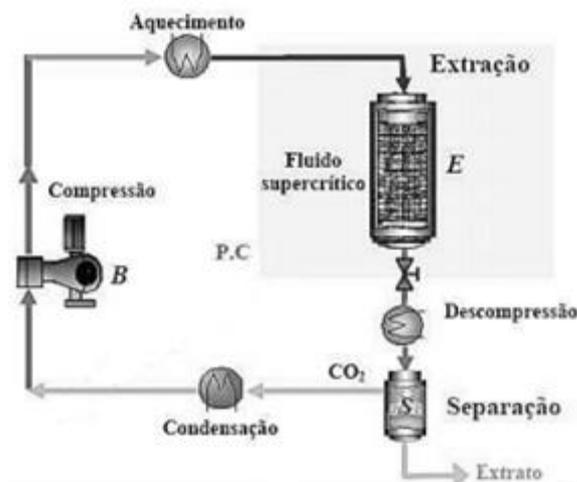
Alguns fatores, como o pH, temperatura, concentração salina e agitação, podem influenciar no equilíbrio. Uma desvantagem é a vida útil da fibra, pois trata-se de material muito sensível a diversas matrizes. Além disso, fatores como tipo do polímero, duração da extração e aditivos provenientes da matriz podem afetar a estabilidade do revestimento. Em estudos envolvendo análises biológicas, a vida útil da fibra foi reduzida de 80 para cerca de 20 amostras (MOEIN *et al.*, 2014).

1.3.3. Extração por fluido supercrítico

Hannay e Hogarth em 1979 foram os pioneiros na SFE que emprega solvente extrator no estado supercrítico (substância com propriedades do estado líquido e gasoso) (LANÇAS, 2002). O meio extrator é um gás com alta densidade, de tal modo que a seletividade e a capacidade de extração tenham força superior a difusão de gases comuns e demais substâncias nele contido (HERRERO *et al.*, 2010).

A SFE a partir de matrizes sólidas e semi-sólidas ocorre em duas etapas: extração e separação. No processo de extração, o fluido supercrítico flui através de um leito fixo de partículas sólidas fixadas com componentes extraíveis (Figura 5). O solvente é então enviado para o extrator e distribuído uniformemente no leito fixo. O solvente junto com os componentes extraídos deixa o extrator e entram no separador, onde a pressão da solução será reduzida, resultando na evaporação do solvente e na precipitação do soluto (CAVALCANTE, 2013).

Figura 5. Processo de extração com fluido supercrítico



Fonte: Adaptado de Cavalcante (2013)

O elevado investimento inicial de equipamentos é a principal desvantagem, o que dificulta a implementação de uma planta industrial, não sendo viável para produtos com baixo valor agregado. Há também os perigos de operação sob altas pressões e a necessidade de adicionar co-solvente para extração de compostos que sejam muito polares (FILIPPIS, 2001; SANTOS, 2011).

1.3.4. Extração por líquido pressurizado

Emprega solvente sob altas temperatura e pressão e sempre abaixo do ponto crítico, de forma que o solvente permaneça líquido durante todo o processo de extração (ALVAREZ-RIVERA *et al.*, 2020). Comparado com a tecnologia desenvolvida sob pressão atmosférica e temperatura ambiente, o uso de alta temperatura está diretamente relacionado à redução da viscosidade do solvente, o que leva ao aumento na capacidade de dissolver o composto alvo, aumentando assim a eficiência de extração. A temperatura também age favorecendo a extração do soluto da matriz, o que otimiza a entrada do solvente na matriz e a difusão do soluto (MENDOZA, 2016).

O processo de extração de analitos provenientes de matrizes sólidas e semi-sólidas é descrita em cinco etapas por Alvarez-Rivera e colaboradores (2020):

- (1) Adição do solvente extrator;
- (2) Dessorção de compostos da matriz (incluindo ou não a quebra de ligações químicas);
- (3) Solvatação dos compostos no solvente de extração;
- (4) Dispersão dos compostos fora da matriz;
- (5) Difusão através da camada de solvente mais próxima ao redor da matriz para

finalmente alcançar o solvente principal.

A eficácia da extração é afetada por três aspectos, sendo esses relacionados ao efeito de matriz, a transferência de massa e a solubilidade. Esses fatores são limitados pela vazão do fluxo, uma vazão apropriada permite o contato entre a amostra e o solvente por um curto período de tempo, permitindo a solubilização do analito de interesse; pressão, o emprego de altas pressões força o solvente a atravessar os poros da matriz facilitando a extração, e com isto, ocorre o favorecimento da transferência de massas; temperatura, altas temperaturas oferecem extrações menos eficientes devido ao alto conteúdo de concomitantes da matriz extraídos no processo; e tempo de extração, o qual é definido pelo tempo que o solvente está em contato com a matriz na pressão, temperatura e fluxo desejado (ALVAREZ-RIVERA *et al.*, 2020).

Apresenta vantagens como maior solubilidade do analito no solvente e eficiência de difusão, os quais são maiores em altas temperaturas (ONG *et al.*, 2000). O custo elevado dos

equipamentos, extração não seletiva e necessidade de *clean-up* da amostra antes da análise cromatográfica são as desvantagens da PLE (JACQUES, 2005).

1.3.5. Extração assistida por microondas

Proposta pela primeira vez em 1986 por Ganzler e colaboradores na extração de gossipol, paration e bromofós de amostras de solos e alimentos. Apresentou maior eficácia quando se comparado à extração convencional por Soxhlet, com maior economia de energia, maior reprodutibilidade, baixo consumo de solvente, manipulação simplificada e com maior frequência analítica (GANZLER; *et al.*, 1986).

Na extração por microondas devido ao aquecimento e evaporação da água existente que ocorre em sistema fechado (praticamente sem perda de calor para o ambiente) a energia convertida em calor aumenta a temperatura interna, o que faz com que aumente também a pressão (RIBEIRO, 2018). Devido à rotação do dipolo molecular induzida por microondas e à migração de íons, o processo de extração assistida por microondas envolve a ruptura das ligações de hidrogênio, o que aumenta a penetração do solvente na matriz e libera produtos intracelulares quebrando a parede celular, dissolvendo as células e liberando os ingredientes a serem extraídos (LI *et al.*, 2010).

Vantagens em relação aos métodos tradicionais como Soxhlet são a possibilidade de atingir níveis de recuperação semelhantes em até trinta minutos utilizando menos solvente (até 30 mL), além do alto rendimento, podendo realizar a extração de até 12 amostras por hora. Por outro lado, apresenta algumas desvantagens como os solventes empregados na extração de Soxhlet não absorverem microondas e a não possibilidade de aplicação na extração MAE. Após a extração é necessário resfriamento e filtração, etapas que acabam prolongando o tempo. É necessário *clean-up* da amostra antes da análise, pois o extrato geralmente contém interferentes (MITRA, 2003).

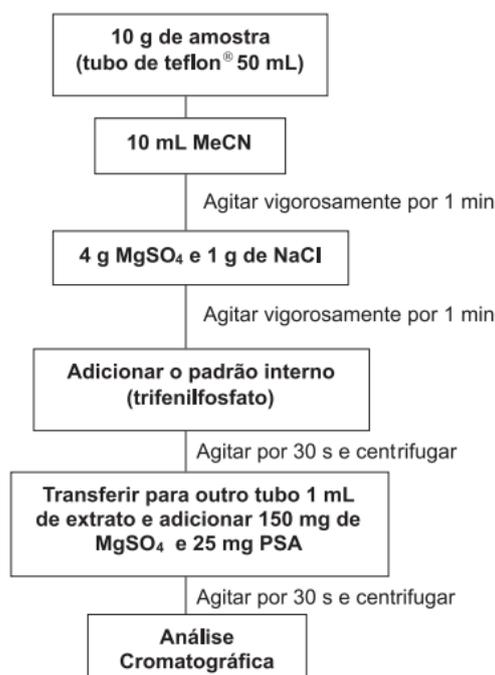
1.3.6. Extração por QuEChERS

Introduzido por Anastassiades e colaboradores em 2003, o método de QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), é um dos mais utilizados em rotina de laboratório para extração de resíduos de pesticidas em matrizes alimentares devido ao seu baixo custo e simplicidade. (PRESTES *et al.*, 2009).

Resumidamente, a extração é baseada na partição líquida utilizando como solvente acetonitrila, seguida de adição de sais NaCl ou MgSO₄, com posterior *clean-up* em fase sólida dispersiva utilizando como sorvente uma amina primária secundária (PSA). Após agitação e

centrifugação, a amostra pode ser levada para análise, conforme Figura 6 (PINTO, 2010; DAMACENO, 2017; PAYÁ *et al.*, 2007).

Figura 6. Fluxograma do método QuEChERS



Fonte: Prestes *et al.* (2009)

É aplicada para análises de multirésíduos, no entanto, por demandar diversas etapas, com muitas variáveis a serem controladas, é passível de erros sistemáticos e aleatórios, resultando em perda do analito ou contaminação do material (PINTO, 2010).

1.3.7. Extração sólido-líquido por partição à baixa temperatura

A extração sólido-líquido por partição à baixa temperatura (SLE-LTP) do inglês *Solid-liquid extraction with low temperature partitioning* é uma alternativa de baixo custo, rápida e simples, para extração de analitos em matrizes complexas, apresentando vantagens destacáveis nos princípios da química limpa como a redução drástica do consumo de solventes orgânicos.

O método consiste em colocar a matriz sólida contendo o analito em contato com solvente menos denso que a água e com ponto de fusão baixo. Por meio da agitação, o analito é transferido para a fase aquosa, e os processos de centrifugação e congelamento auxiliam na separação de fases (PUSSENTE, 2008; GOULART, 2017).

Alguns aspectos a respeito do solvente extrator devem ser considerados: (i) compatibilidade com o analito (extração eficiente conforme polaridade e estabilidade do analito);

(ii) seletividade (habilidade de evitar efeito de matriz); (iii) miscibilidade com a água; (iv) segurança para o analista e para o meio ambiente e (v) custo (MALTOVSKÁ; LEHOTAY, 2004).

Santana *et al.* (2018) empregaram a SLE-LTP em resíduos de agrotóxicos provenientes de polpa de cajá-manga. O solvente extrator utilizado foi a acetonitrila (6 mL) e o congelamento ocorreu na temperatura de - 4 °C por 90 minutos. Recuperações na ordem de 75 a 129% com limite de detecção entre 0,17 a 0,43 $\mu\text{g g}^{-1}$ foram estimados para quatro pesticidas estudados. As vantagens apontadas em relação às metodologias convencionais para extração de pesticidas em alimentos foram o menor volume de solvente orgânico, menor tempo de congelamento e massa de amostra inferior a 75%. Além disso, mesmo a matriz apresentando coloração intensa e alto teor de substâncias solúveis, não foi necessária etapa de *clean-up*.

Em 2015, Araújo *et al.* otimizaram a SLE-LTP para extração dos pesticidas haloxifop-metil, procimidona e linuron de amostras de cenoura. O solvente extrator empregado foi acetonitrila (4 mL), seguido de agitação em mesa orbital a 200 rpm, centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos e congelamento a - 20 °C por 4 horas. As faixas de limites de detecção e de quantificação para os pesticidas foram estimadas em 0,16 a 0,23 mg kg^{-1} e 0,48 a 0,69 mg kg^{-1} , respectivamente. Recuperações entre 91 a 107% foram alcançadas e as principais vantagens destacadas foram a simplicidade e redução do volume solvente extrator empregado.

Morais *et al.* (2014) utilizaram na SLE-LTP mistura extratora de 7 mL de acetonitrila, 1,5 mL de água e 1,5 mL de acetato de etila para extração de resíduos de tiamethoxam, triadimenol e deltametrina em amostras de abacaxi. A etapa de congelamento (- 20 °C) e *clean-up* foram realizados por 12 horas e com florisil, respectivamente. A metodologia apresentou-se eficiente, de baixo custo, com boas recuperações (78 a 103%) e baixos limites de detecção (0,012 a 0,051 $\mu\text{g g}^{-1}$) e quantificação (0,04 a 0,17 $\mu\text{g g}^{-1}$).

1.4. Química verde

A química verde, também conhecida como química sustentável, visa prevenir a poluição, aplicar soluções científicas inovadoras, reduzir o impacto negativo de produtos e processos químicos na saúde humana e no meio ambiente (EPA).

No contexto de crescente atenção à poluição química e ao esgotamento de recursos, foi somente na década de 1990 que a química verde emergiu de várias ideias e trabalhos de pesquisas existentes, como economia atômica e catálise. O desenvolvimento da química verde nos Estados Unidos e na Europa está relacionado às mudanças nas estratégias para resolver problemas

ambientais, como reduzir as emissões industriais para prevenir ativamente a poluição (LINTHORST, 2009).

Em certas áreas de pesquisa, como catálise, formulações de solventes que são menos prejudiciais ao meio ambiente e criação de processos usando matérias-primas renováveis, a química verde tem feito progressos. Além dos métodos mais tradicionais, existem pesquisas relacionadas as mais diversas áreas da química, como a sonoquímica, que tem como objetivo o aumento da eficiência e a redução dos custos de insumos com o uso do ultrassom (SOUSA-AGUIAR *et al.*, 2014).

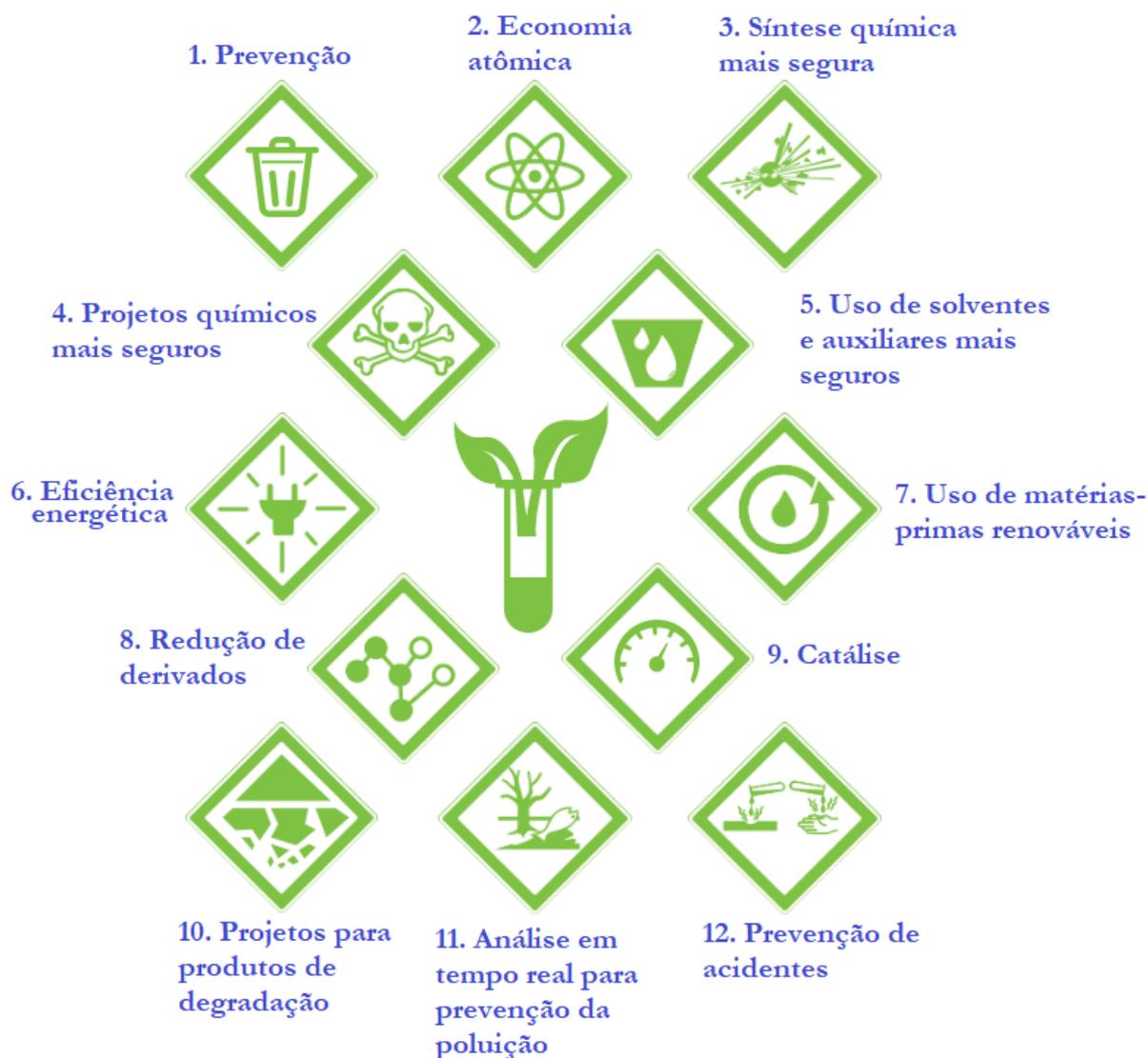
O conceito de química verde é tão abrangente que estende muito além do escopo dos laboratórios de pesquisa e alcança a indústria, a educação, o meio ambiente e o público. Com o entusiasmo científico pela química verde, os programas de ensino, o financiamento do governo e o estabelecimento de centros de pesquisa em química verde dobraram nas últimas duas décadas, sendo ofertado, por muitas instituições, os cursos de química verde e de engenharia verde (ANASTAS; EGHBALI, 2010).

A estrutura da química verde pode ser resumida em 3 pontos: (i) implementação de projetos; (ii) comprometimento em reduzir riscos inerentes e (iii) sistema coeso de princípios ou diretrizes de planejamento (ANASTAS; EGHBALI, 2010).

Em 1998, os pesquisadores Anastas e Eghbali propuseram os “Doze Princípios da Química Verde” (Figura 7), os quais orientam o projeto de novos processos e produtos, desde a matéria prima que é utilizada até a biodegradabilidade.

Esses princípios estão resumidos a seguir e tem como objetivo fornecer concepção inicial do que tornaria um produto ou processo químico mais ambientalmente amigável.

Figura 7. Os “12 princípios da química verde” propostos por Anastas e Eghbali (1998)



Fonte: Adaptado de Hems (2019)

1.5. Imagens digitais

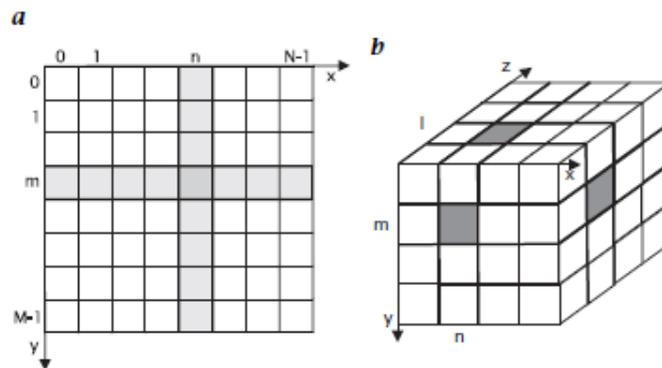
De acordo com Gonzalez e Woods (2018, p.24):

Uma imagem pode ser definida como uma função bidimensional, $f(x, y)$, onde x e y são coordenadas espaciais (planas) e a amplitude de f em qualquer par de coordenadas (x, y) é chamada de intensidade ou nível de cinza da imagem nesse ponto. Quando x , y e os valores de intensidade de f são todas quantidades finitas e discretas, chamamos a imagem de imagem digital. O campo do processamento digital de imagens refere-se ao

processamento de imagens digitais por meio de um computador digital. Observe que, uma imagem digital é composta por um número finito de elementos, cada um dos quais com uma localização e valor específico. Esses elementos são chamados de elementos pictóricos, elementos de imagem, pels e pixels.

De acordo com Jähne (2005) computadores não são capazes de processar imagens contínuas, apenas matrizes numéricas, sendo necessária representação como arranjos bidimensionais de pontos. Um ponto na grade 2-D é chamado de pixel ou pel (abreviaturas do elemento *Word Picture*), representam o fluxo radiante na posição da grade correspondente. Em casos mais simples, os pixels estão em uma grade retangular (Figura 8). A posição dos pixels é fornecida em notação matricial geral. O primeiro índice m indica a posição da linha e o segundo índice n indica a posição da coluna.

Figura 8. Representação de imagens digitais por matrizes de pontos discretos em uma grade retangular (a) 2D e (b) 3D



Fonte: Jähne (2005)

A complexidade do processo de visualização quantitativa depende do processamento de imagem. Se o objetivo é apenas fazer uma medição da geometria precisa de um objeto, configurar a iluminação é suficiente. Nesse caso, não é necessário estabelecer relação quantitativa entre as características do objeto alvo e a radiação emitida em direção à câmera. Por outro lado, é necessário saber exatamente a relação entre as características desejadas e a radiação emitida caso queira medir certas características específicas, como densidade, temperatura, orientação na superfície ou concentração de uma espécie química. Um exemplo é a detecção de objetos a partir da cor, a dependência espectral do coeficiente de reflexão (JÄHNE, 2005).

A colorimetria de imagens digitais (DIC, do inglês *digital image colorimetry*) é a análise do produto final colorido da reação do analito com reagente apropriado (CHOODUM *et al.*, 2017). O DIC conta com dois processos, a aquisição da imagem e a posterior leitura de cores que podem ser

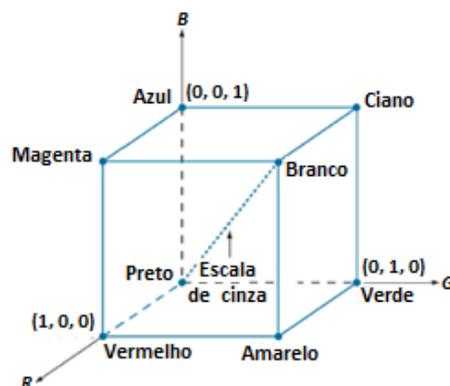
implementados com *smartphone* e software de processamento de imagem, respectivamente (LIN *et al.*, 2018, BENEDETTI, 2013).

A análise da imagem digital é baseada, principalmente, nas cores vermelho, verde e azul (RGB, do inglês *red, green and blue*), pois qualquer cor pode ser decomposta nessas três cores básicas para posterior leitura pelo software ou aplicativo. Para cada cor, há um valor numérico inteiro entre 0 e 255. O Colorgrab® ou Photometrix® são aplicativos de acesso livre para *smartphone* para captura das cores (LIN *et al.*, 2018).

Segundo Gonzalez e Woods (2018, p.623):

No modelo RGB, cada cor aparece em seus componentes espectrais primários de vermelho, verde e azul. Este modelo é baseado em um sistema de coordenadas cartesianas. O subespaço de cores de interesse é o cubo mostrado na Fig. 9, no qual os valores primários RGB estão em três vértices; as cores secundárias ciano, magenta e amarelo estão em três outros cantos; o preto está na origem; e o branco está no canto mais distante da origem. Neste modelo, a escala de cinza (pontos de valores RGB iguais) se estende do preto ao branco ao longo da linha que une esses dois pontos. As diferentes cores neste modelo são pontos no cubo ou dentro dele e são definidas por vetores que se estendem desde a origem. Para conveniência, a suposição é que todos os valores de cor foram normalizados, de modo que o cubo da Fig. 9 é o cubo unitário. Ou seja, todos os valores de R, G e B nesta representação são assumidos como estando no intervalo [0, 1]. Observe que os primários RGB podem ser interpretados como unidades vetores que emanam da origem do cubo.

Figura 9. Esquema do cubo de cores RGB



Fonte: Gonzalez e Woods (2018)

Desde o século passado, as imagens digitais vêm sendo empregadas como fonte de informação analítica. O primeiro trabalho a descrever o uso das imagens digitais foi empregando scanner para conversão de exames médicos em dados digitais, criando bases para diagnóstico mais rápido e preciso.

Duas décadas mais tarde, Geladi *et al.* (1986) publicaram o primeiro trabalho em que descrevem o emprego da quimiometria para processar imagens digitais. A partir disto, foram publicados diversos artigos que utilizaram diferentes instrumentos para a captura de imagens, como telefones celulares, *webcams*, *scanners* de *desktop* e câmeras digitais (BOTELHO, 2014). O uso desses instrumentos equipados com câmeras fotográficas tornou-se uma ferramenta de análise importante que pode ser empregada para diversas aplicações. Isso se deve ao desenvolvimento de equipamentos integrados com resolução maior, o que permite ter melhor desempenho na obtenção e processamento de imagens (BENEDETTI, 2013).

O interesse no emprego de medições baseadas em imagens digitais para quantificar substâncias em alimentos vem crescendo devido a praticidade, rapidez, facilidade de manuseio, baixo custo e a baixa geração de resíduos ao fim do processo (KRIGGER, 2019).

Em 2018, Acevedo *et al.* utilizaram as imagens digitais para determinação de surfactantes aniônicos em leite através da precipitação de proteínas simultaneamente com a microextração líquido-líquido. A determinação dos surfactantes foi baseada no método azul de metileno e, com o emprego de apenas 100 μL de amostra, 25 μg de azul de metileno e 2,9 mg de EDTA, os autores alcançaram resposta linear entre 10 e 50 mg L^{-1} , limite de detecção 2,2 mg L^{-1} e coeficiente de variação de 1,9% ($n = 10$). As vantagens foram simplicidade, rapidez, sensibilidade adequada e metodologia ambientalmente amigável, características que estão de acordo com os requisitos da química limpa.

Caleb, Alshana e Ertas (2021) empregaram as imagens digitais combinada microextração líquido-líquido dispersiva de gota orgânica solidificada flutuante na determinação de íon iodato em sal de cozinha. A determinação do iodato foi baseada na reação redox do iodato com íons iodeto em meio ácido, resultando em solução amarelada. Empregando 500 μL solvente extrator 1-undecanol, 1,5 mL etanol como solvente dispersor e 5 mL de solução da amostra, coeficiente de variação menores que 5,6% ($n=3$), limite de detecção 0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, limite de quantificação 0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e recuperações entre 89,3 e 109,3% foram estimados. O método proposto apresentou vantagens como análise rápida, simples e economicamente favorável.

Franco e colaboradores (2016), empregaram a imagem digital para determinação de metanol em cachaça. A determinação consistiu na oxidação do metanol a metanal com subsequente reação com ácido cromotrópico. Os limites de detecção e de quantificação foram estimados em 1,5 e 5,0 $\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ de metanol anidro, respectivamente. Recuperações foram estimadas entre 83 e 110%. O procedimento desenvolvido apresentou baixo consumo de reagentes, 800 μL por determinação, economicamente e ambientalmente viável.

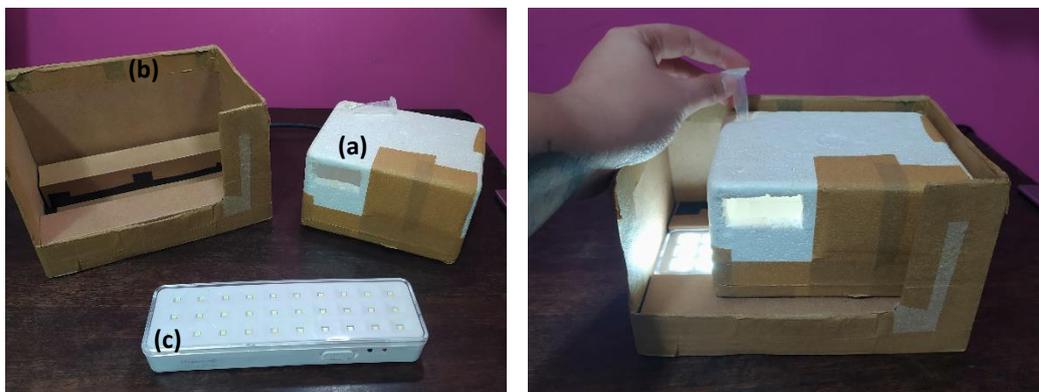
2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Equipamentos e acessórios

O preparo de amostras foi realizado por meio de uma mesa agitadora orbital (Quimis – Q225M), uma centrífuga microprocessada para tubos (Quimis – Q222TM) e um ultra congelador (ColdLab – CL580-86V).

Para obtenção das imagens digitais, uma caixa de isopor (Figura 10a) com 14, 16 e 10 cm de altura, largura e profundidade, respectivamente, foi empregada como suporte para o celular; a caixa apresenta entrada de tubos tipo Eppendorf® de 1,5 mL pela parte superior e abertura lateral de tamanho suficiente para adequar à câmera do *smartphone* (Xiaomi, modelo Redmi Note 8, câmera de 48 megapixels e sistema operacional Android 9.0). Uma caixa auxiliar foi empregada para suporte da caixa de isopor e a lâmpada de LED (Figura 10b). Os tubos foram posicionados de forma que as leituras fossem realizadas perpendicularmente à câmera, mantendo-se uma distância de 9 cm. O controle da iluminação foi realizado utilizando lâmpada de LED (Figura 10c) de saída de emergência (Elgin, 2 W). O aplicativo empregado nas medidas RGB foi o ColorGrab® (versão 3.6.1, Loomatix©), disponível gratuitamente (Figura 11).

Figura 10. Esquema de montagem para obtenção das imagens digitais. (a) caixa de isopor; (b) caixa auxiliar e (c) lâmpada de LED



Fonte: Autor

Figura 11. Obtenção da imagem digital com auxílio do aplicativo de acesso gratuito ColorGrab®



Fonte: Autor

Um espectrofotômetro UV-Vis (Agilent, modelo Cary 60), equipado com cubeta de acrílico de volume reduzido (1 cm) foi empregado para as medidas espectrofotométricas. O software Cary WinUV® foi utilizado para aquisição de dados.

2.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada e reagentes de grau analítico. As soluções de referência de propoxur $30 - 800 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram preparadas por diluição da solução estoque $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em metanol, as quais foram armazenadas em geladeira ($4 \text{ }^\circ\text{C}$). Alíquotas de solução de NaOH $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ foram utilizadas para hidrólise do pesticida.

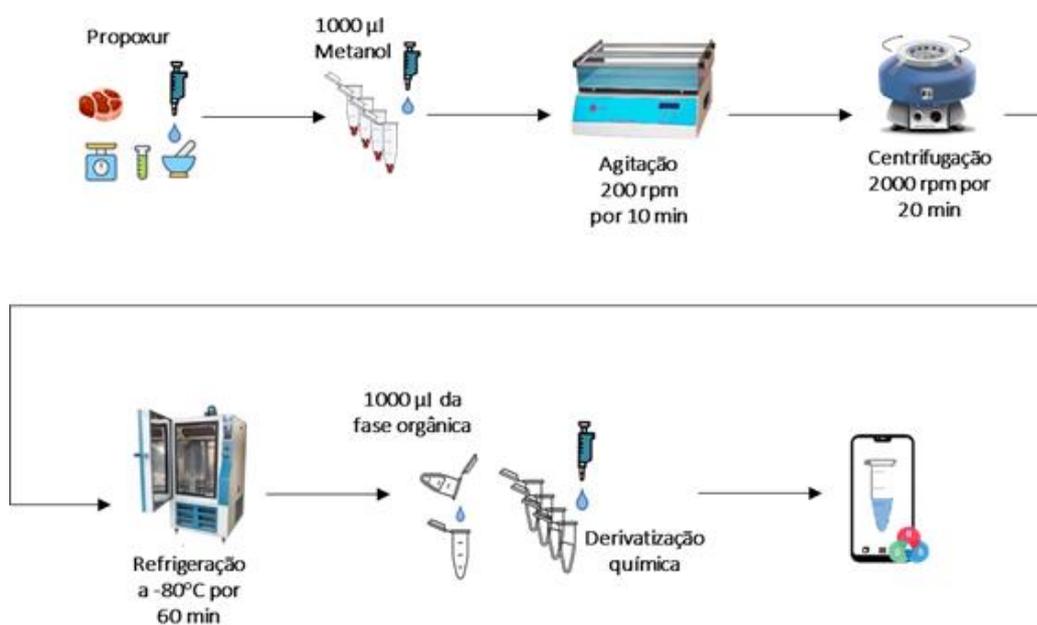
Soluções de *p*-aminofenol $6,9 \text{ mmol L}^{-1}$ foram preparadas por dissolução de quantidade apropriada do reagente em água. As soluções de *p*-aminofenol foram preparadas diariamente. Como solvente extrator foi utilizado metanol.

As amostras de carne *in-natura* foram adquiridas em açougues da cidade de Piracicaba - SP, conservadas a $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ e estabilizadas a temperatura ambiente imediatamente antes das análises.

2.3. Procedimento experimental

A amostra, previamente descongelada, foi transferida para almofariz (1,25 g de carne bovina moída magra), adicionadas 250 μL da solução de propoxur $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e homogeneizadas com auxílio de um pistilo. Para a extração do propoxur, em tubos tipo Eppendorf® de 1,5 mL contendo 0,25 g de amostra de carne fortificada, foram adicionados 1000 μL de metanol; agitados por 10 min a 200 rpm; centrifugados por 20 min a 2000 rpm e refrigerados por 60 minutos a -80°C . Em seguida, a fase orgânica foi vertida para outro tubo tipo Eppendorf® para realização da derivatização química e quantificação, conforme esquema da Figura 12.

Figura 12. Procedimento experimental



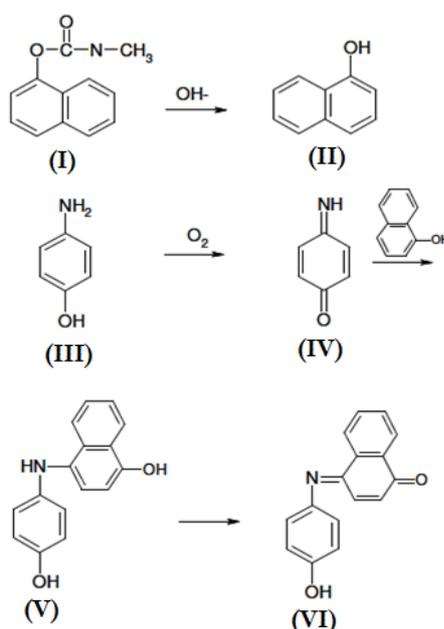
Fonte: Autor

Na fase orgânica contendo o propoxur, foram adicionados 100 μL de NaOH $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ e 100 μL de p-aminofenol $6,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, aguardou-se o tempo de 150 minutos para a reação do azul de indofenol. Por fim, foi realizada a leitura por imagem digital, onde o canal R, vermelho, do sistema RGB foi o selecionado para as medidas por ser a cor complementar ao do complexo analisado, azul. As medidas foram realizadas em triplicata e a temperatura ambiente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação do propoxur foi baseada na formação do azul de indofenol como apresentado na Figura 13. O propoxur (I) foi hidrolisado em meio alcalino, formando 2-isopropoxifenol (II), que reagiu com a forma oxidada do *p*-aminofenol (III), gerado pela reação com oxigênio dissolvido. A reação produziu a benzoquinonaimina (IV) altamente reativa, que reagiu na posição para livre do composto fenólico por ataque eletrofílico para produzir a espécie (V). Os compostos formados sofreram rápida oxidação, produzindo o azul de indofenol (VI) (MELCHERT, 2009).

Figura 13. Esquema das reações envolvidas na formação do azul de indofenol a partir do propoxur



Fonte: Adaptado de Melchert (2009)

3.1. Procedimento de fortificação e homogeneização da amostra

O procedimento foi baseado na adição do analito, de concentração conhecida, à amostra, de modo que fosse possível a verificação dos valores de recuperação do método analítico, conforme SKOOG, 2006.

A otimização foi realizada empregando três procedimentos distintos para fortificação e homogeneização:

(i) direta em microtubo tipo Eppendorf® contendo 0,25 g de amostra com 50 μL de propoxur nas concentrações $5,0 \times 10^{-5}$ e $2,5 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} , homogeneizado com auxílio de ponteira amarela de 200 μL ;

(ii) saco plástico com fechamento hermético contendo 1,25 g de amostra com 250 μL de propoxur nas concentrações $5,0 \times 10^{-5}$ e $2,5 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} , homogeneizado manualmente por dois minutos;

(iii) almofariz contendo 1,25 g de amostra com 250 μL de propoxur nas concentrações $5,0 \times 10^{-5}$ e $2,5 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} , homogeneizado com auxílio de pistilo por dois minutos.

Após comparação dos valores de recuperação das amostras fortificadas com os padrões analíticos na ausência da amostra de carne, os resultados são apresentados em porcentagens de recuperação do propoxur (Tabela 1), após medida de reflectância por imagens digitais do azul de indofenol formado na derivatização química.

Tabela 1. Porcentagens de recuperação de propoxur ($n = 3$) obtidas empregando maneiras diferentes de fortificação e homogeneização

Homogeneização	Propoxur (mol L^{-1})	
	Recuperação (%)	
	$5,0 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-4}$
Microtubo	$103,6 \pm 1,1$	$87,3 \pm 2,1$
Saco plástico fecho hermético	$103,6 \pm 0,6$	$78,8 \pm 2,0$
Almofariz	$98,4 \pm 2,0$	$80,0 \pm 1,5$

Conforme pode ser observado na Tabela 1, os procedimentos de fortificação e homogeneização estudados apresentaram boas porcentagens de recuperação, com valores entre 79 e 104%, mostrando que os três procedimentos podem ser empregados. Nos ensaios realizados em saco plástico com fechamento hermético houve, ao final da homogeneização, vazamento do conteúdo líquido de duas amostras pelas extremidades do saco em decorrência de uma pequena fissura que pode ter ocorrido durante o processo de homogeneização. Então, as amostras tiveram de ser repetidas para obtenção das réplicas. O fato poderia ocorrer com outras amostras, sendo necessárias novas repetições, tornando o procedimento moroso, cansativo e passível de perdas.

Afim de tornar as análises menos laboriosas e considerando a facilidade de operação (maior quantidade de amostra para subdivisão posterior), o almofariz foi selecionado para os estudos subsequentes.

3.2. Procedimento de extração do propoxur

3.2.1. Otimização da massa de amostra

O estudo foi conduzido empregando 0,1 a 1,0 g de amostra de carne sem e com fortificação com propoxur $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, mediante emprego do almofariz, com posterior subdivisão da amostra em microtubos. Os resultados de recuperação de propoxur são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Porcentagens de recuperação de propoxur $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (n = 3) obtidas empregando diferentes massas de amostras de carne bovina

Massa de carne (g)	Recuperação (%)
0,10	78,8 ± 0,7
0,25	83,3 ± 2,0
0,50	65,2 ± 2,2
0,75	70,0 ± 1,6
1,00	81,1 ± 4,5

Conforme Tabela 2, as recuperações estimadas de propoxur $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ na carne bovina, variando a massa de amostra, foram 65 a 83% com desvios padrão menor que 2%. Somente para quantidade de amostra de 1,00 g foi observado maior desvio (4,5%), demonstrando que para quantidades maiores de amostra, há interferência devido a presença de componentes oriundos da matriz na amostra, levando a diminuição da precisão. A massa de carne bovina de 0,25 g foi escolhida para os próximos estudos devido a maior recuperação estimada mantendo a precisão entre as análises (83,3 ± 2,0 %).

3.2.2. Otimização do volume de solução de fortificação

O volume da solução de fortificação de propoxur $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ foi avaliado entre 10 e 100 µL empregados na massa de carne selecionada anteriormente (0,25 g). Os resultados de recuperação de propoxur são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Porcentagem de recuperação de propoxur $8,0 \times 10^{-4}$ ($n = 3$) obtidas empregando diferentes volumes de solução de fortificação

Solução de fortificação (μL)	Recuperação (%)
10	$108,9 \pm 2,5$
30	$105,9 \pm 2,0$
50	$96,2 \pm 1,1$
75	$90,6 \pm 2,0$
100	$84,0 \pm 4,0$

Os valores estimados para as recuperações de propoxur $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, entre 84 e 109%, conforme Tabela 3, estão dentro dos aceitáveis por órgãos regulamentadores (70 - 120%). Para facilitar a fortificação e homogeneização do analito na amostra, o volume selecionado foi de 50 μL .

3.2.3. Otimização do solvente extrator

Solventes extratores relatados na literatura e empregados na SLE-LTP como acetonitrila, metanol e etanol, foram avaliados de maneira a alcançar maiores eficiência de extrações. As avaliações foram realizadas por meio de ensaios de adição e recuperação de propoxur $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em 0,25 g de carne bovina.

Com o intuito de diminuir o tempo de congelamento para favorecer a frequência de análises, foi empregado ultracongelador no estudo. Em decorrência da temperatura do ultracongelador ($- 80 \text{ }^\circ\text{C}$) e do ponto de fusão da acetonitrila ($- 45 \text{ }^\circ\text{C}$), o solvente em questão foi descartado, realizando o estudo somente com etanol (P.F.: $- 114 \text{ }^\circ\text{C}$) e metanol (P.F.: $- 98 \text{ }^\circ\text{C}$), os resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Porcentagens de recuperação de propoxur $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($n = 3$) obtidas empregando solventes extratores

Solvente extrator	Recuperação (%)
Etanol	$81,5 \pm 0,6$
Metanol	$99,6 \pm 3,0$

O metanol foi o solvente que melhor extraiu o propoxur da amostra, com valores de recuperação estimados em $99,6 \pm 3,0\%$ (Tabela 4). Isto era esperado devido a polaridade do metanol (0,762) ser maior do que do etanol (0,654) resultando em uma maior interação com o analito e com isto, maior recuperação do mesmo (REICHARDT; WELTON, 2011).

Procurando obter o máximo de eficiência nas extrações, foram também avaliados os volumes do solvente extrator (metanol) entre 250 e 1000 μL . As avaliações foram realizadas por

meio de ensaios de adição e recuperação (Tabela 5) de propoxur $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em 0,25 g de carne bovina.

Tabela 5. Porcentagens de recuperação de propoxur $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (n = 3) obtidas empregando diferentes volumes de solvente extrator

Solvente extrator (μL)	Recuperação (%)
250	53,2 \pm 10,1
500	85,9 \pm 2,3
750	95,0 \pm 0,1
1000	103,0 \pm 0,1

Conforme pode ser observado na Tabela 5, quanto maior o volume de solvente extrator, maior foi a porcentagem de recuperação, uma vez que houve mais solvente em contato com a massa de carne proporcionando maior extração. Analogamente, foi observado com menor volume de solvente extrator (250 μ L) uma maior dificuldade na extração do analito e menores exatidão e precisão das medidas (recuperações abaixo de 60% com desvios padrão acima de 10%). Diante disto, o volume de 1000 μ L foi considerado o mais adequado, com recuperação estimada em 103,0 \pm 0,1%.

3.2.4. Otimização do tempo de agitação

A etapa de agitação é importante, pois favorece a extração do analito presente na amostra para o solvente extrator em decorrência da interação física entre o solvente e a amostra. Além disso, concomitantes presentes na matriz da amostra também podem ser extraídos nesse momento. Então, estudos mais detalhados dos efeitos do tempo de agitação (10 - 120 minutos) com emprego da mesa com movimento orbitais foram avaliados buscando menor tempo de agitação com máxima extração do analito. As avaliações foram realizadas por meio de ensaios de adição e recuperação de propoxur $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em 0,25 g de carne bovina. Os sinais de reflectância para o propoxur $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (a) e o branco analítico (b) são apresentados na Figura 14.

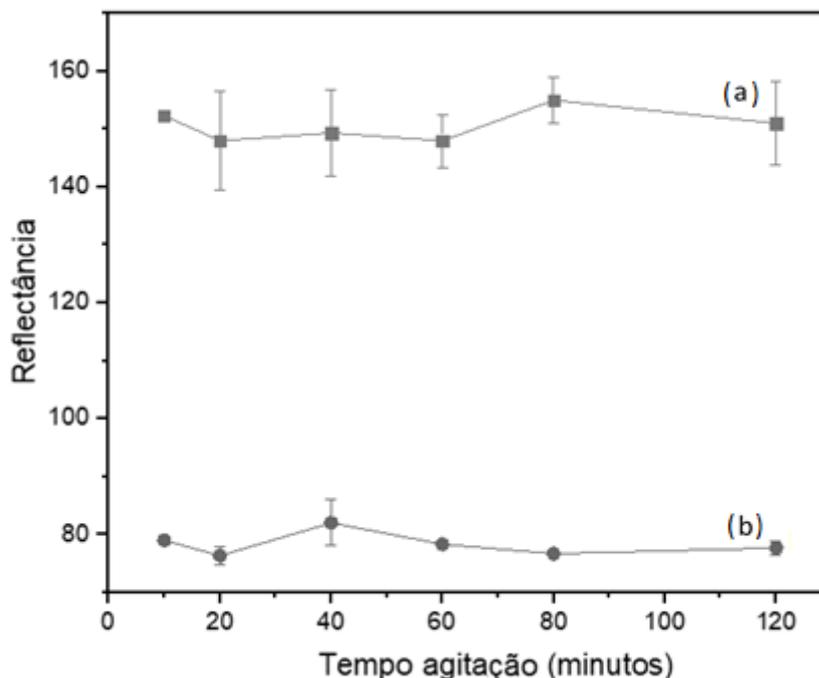


Figura 14. Efeito do tempo da agitação sob o sinal de reflectância do propoxur $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (a) e do branco analítico (b).

Os resultados obtidos na Figura 14 foram comparados com sinais de reflectância de padrões analíticos na mesma concentração de propoxur submetidos aos mesmos procedimentos, e as recuperações do analito foram estimadas entre 82,4 a 87,9%. Os tempos estudados apresentaram porcentagem de recuperação próximos entre si, devido a isto, o tempo de 10 minutos ($87,9 \pm 0,6\%$) foi o selecionado por ser menor e apresentar menor desvio padrão, garantindo a repetibilidade entre as medidas.

3.2.5. Otimização do tempo de centrifugação

Após a transferência do analito para a fase orgânica, a solução foi centrifugada para que o processo de separação entre as fases fosse acelerado. Para tanto, os tempos (10 – 120 minutos) de centrifugação a 2000 rpm foram avaliados. As avaliações foram realizadas por meio de ensaios de adição e recuperação de propoxur $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em 0,25 g de carne bovina. Os sinais de reflectância para o propoxur $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (a) e o branco analítico (b) são apresentados na Figura 15.

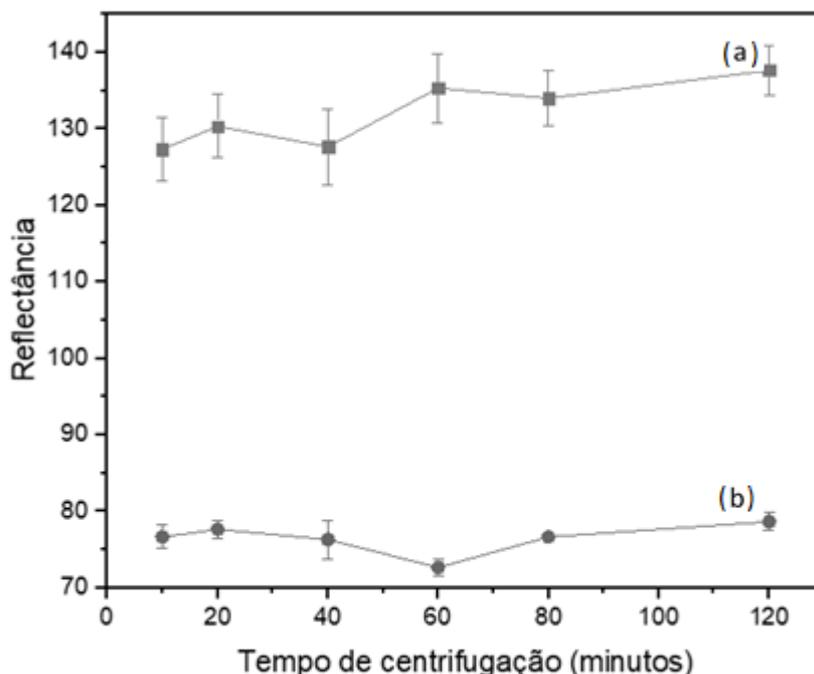


Figura 15. Efeito do tempo da centrifugação sob o sinal de reflectância do propoxur $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (a) e do branco analítico (b).

A etapa de centrifugação teve como objetivo auxiliar a separação das fases, sedimentação da matriz sólida na parte inferior do tubo e fase orgânica na parte superior do tubo. Após comparação dos sinais de reflectância (Figura 15) com padrões analíticos de propoxur, as recuperações foram estimadas entre 82,9 e 90,0%. O tempo de 20 minutos foi selecionado para os próximos estudos ($85,6 \pm 4,2\%$), pois acima deste tempo, não foram observadas diferenças significativas nos ensaios de adição-recuperação.

3.2.6. Otimização do tempo de congelamento

A SLE-LTP consiste na partição entre as fases à baixa temperatura. Buscando obter eficiência na separação das fases, o tempo de congelamento da amostra precisa ser suficiente para solidificar a matriz e a água presente. Com isto, foi possível garantir que o pesticida extraído se mantinha na fase orgânica que não foi congelada.

Diante disto, o tempo de congelamento foi avaliado entre 20 - 120 minutos em ultra congelador ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$). As avaliações foram realizadas por meio de ensaios de adição e recuperação de propoxur $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em 0,25 g de carne bovina. Os sinais de reflectância para o propoxur $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (a) e o branco analítico (b) são apresentados na Figura 16.

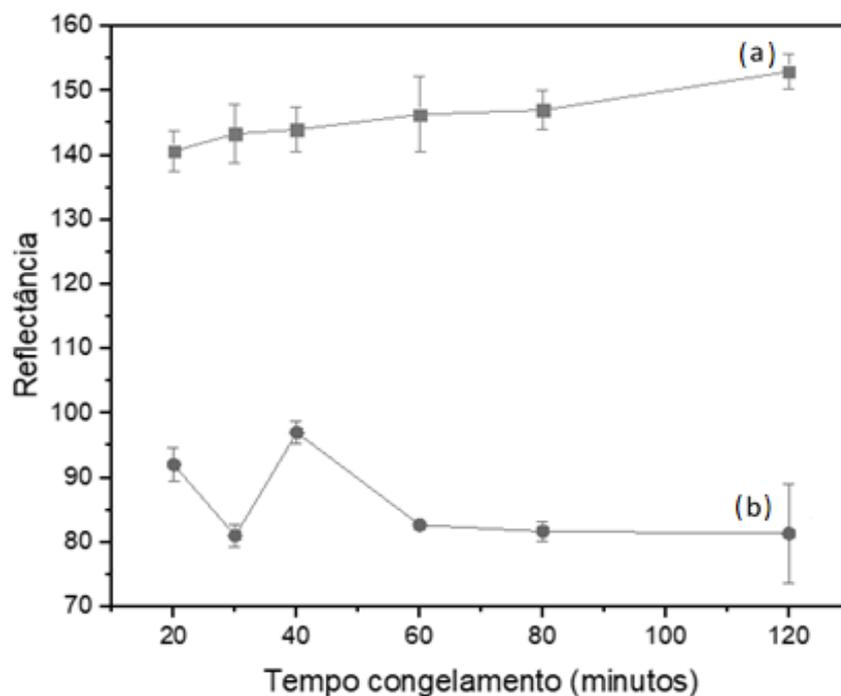


Figura 16. Efeito do tempo de congelamento sob o sinal de reflectância do propoxur $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (a) e do branco analítico (b).

A partir dos sinais de reflectância da Figura 16, recuperações de propoxur foram estimadas entre 81,5 e 87,8%. Acima de 60 minutos de congelamento, não foram observadas diferenças significativas nos resultados obtidos. Então, o tempo de congelamento de 60 minutos com recuperações estimadas em $84,9 \pm 5,9\%$ foi selecionado, sendo suficiente para congelar a matriz da amostra e não causar interferências nos sinais de reflectância.

Ao final das otimizações dos parâmetros (Tabela 6), o resultado visual da SLE-LTP é apresentado na Figura 17, onde a fase congelada da matriz da amostra está localizada na parte inferior do tubo e a fase orgânica contendo o analito na fase superior do tubo que seguirá para a derivatização química.

Tabela 6. Parâmetros otimizados da SLE-LTP para extração de propoxur da carne bovina

Parâmetros analisados	Avaliado	Selecionado
Procedimento de fortificação e homogeneização	Microtubo, Saco plástico e Almofariz	Almofariz
Massa de amostra (g)	0,10 - 1,00	0,25
Volume de solução de fortificação (μL)	10 - 100	50
Tipo de solvente extrator	Etanol e metanol	Metanol
Volume de solvente extrator (μL)	250 - 1000	1000
Tempo de agitação (min)	10 - 120	10
Tempo de centrifugação (min)	10 - 120	20
Tempo de congelamento (min)	20 - 120	60

Figura 17. Foto da SLE-LTP na extração do propoxur da carne bovina, após parâmetros otimizados



Fonte: Autor.

3.3. Características analíticas

A formação do azul de indofenol envolve reação lenta entre o pesticida hidrolisado e o *p*-aminofenol, este tempo foi otimizado em 150 minutos, buscando maiores respostas analíticas. Desta maneira, as características analíticas obtidas estão apresentadas na Tabela 7.

Curva analítica (medidas em triplicata) foi obtida entre $4,0 \times 10^{-5}$ a $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de propoxur, descrita pela equação Sinal analítico = $73 + 103 \times 10^3 C$ (mol L⁻¹), R = 0,999. Os limites de detecção e quantificação foram estimados em $3,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. O limite de detecção (LD) foi estimado diluindo a solução padrão de propoxur e avaliando a menor concentração que gerou um sinal de reflectância significativamente diferente do branco analítico. O limite de quantificação (LQ) foi estimado seguindo o mesmo modelo do LD, onde foi realizada avaliação com a menor concentração que pode ser quantitativamente. O coeficiente de variação foi estimado em 0,66% (n = 11).

Ao final de cada determinação foram consumidos 75,3 µg de *p*-aminofenol, 1000 µL de metanol, 1000 µg de NaOH e gerados 1,2 mL de resíduos.

Tabela 7. Características analíticas do procedimento desenvolvido

Características analíticas	
Resposta linear (mol L ⁻¹)	$3,0 \times 10^{-5}$ a $8,0 \times 10^{-4}$
Equação da reta	Sinal analítico = $73 + 103 \times 10^3 C$
Limite de detecção (mol L ⁻¹)	$3,0 \times 10^{-5}$
Limite de quantificação (mol L ⁻¹)	$3,0 \times 10^{-5}$
Coeficiente de variação % (n=11)	0,66

A metodologia de extração proposta (SLE-LTP) para propoxur em carne bovina mostrou ser eficiente como outras metodologias de preparo de amostra presentes na literatura (Tabela 8). Vantagens como emprego de menor volume de solvente extrator (1 mL) comparado aos demais trabalhos foram alcançadas e com isto, menor geração de resíduos. Em contraste com trabalho oficial de extração de propoxur em amostras de carne bovina (ARGAUER *et al.*, 1995), houve uma redução de 200 vezes no volume de solvente empregado. O volume empregado somente foi maior ao comparar com procedimento de extração de propoxur em água (DEMIR *et al.*, 2020) que é uma matriz muito mais simples que a carne bovina.

A geração de resíduos é outro ponto que faz o procedimento proposto ter vantagem destacável frente aos demais, produzindo apenas 1,2 mL de resíduo por determinação. Esta quantidade foi 8,3 e 188 vezes menor do que os trabalhos que empregaram QuEChERS (VARELA-MARTÍNEZ *et al.*, 2019; MADUREIRA, 2012 e MORAIS, 2013) e SFE (ARGAUER, *et al.*, 1995), respectivamente (Tabela 8). A mínima geração de resíduo é o primeiro dos 12 princípios da química verde, e tem como base a redução da poluição ambiental e custos de descartes que o processo possa gerar.

As porcentagens de recuperação das metodologias apresentadas na Tabela 8 foram estimadas na faixa de 70 – 103%. O método proposto apresentou recuperação em 90%, dentro da faixa de 70 a 120%, estabelecida pela literatura no âmbito de pesquisa sobre resíduos de pesticidas (BRITO *et al.*, 2003).

A possibilidade de emprego de apenas um único solvente, o metanol, representa vantagens, o qual é menos tóxico que um dos solventes mais empregados em metodologias de extrações de propoxur, a acetonitrila (ARGAUER *et al.*, 1995; VARELA-MARTÍNEZ, *et al.*, 2019; SIVAPERUMAL *et al.*, 2015; MADUREIRA, 2012; MORAIS, 2013; PEREIRA, 2018 e FANG *et al.*; 2017) cuja forma metabolizada é o cianeto, que é severamente tóxico para animais e humanos (JOSHI; ADHIKARI, 2019).

O procedimento proposto é prático, necessita de poucas quantidades de amostra e solvente, com baixo custo de análise e com poucas etapas, fazendo da SLE-LTP um método com reduzida geração de resíduos, reduzindo o risco de possíveis impactos ambientais.

Tabela 8. Metodologias utilizadas para análise de propoxur em alimentos e bebidas

Extração	Amostra	Solvente	Volume de solvente (mL)	Recuperação (%)	Volume de resíduo gerado (mL)	Referência
SFE	Carne	Acetonitrila	200	85	225	Argauer <i>et al.</i> (1995)
VA-DLLME	Uva passas	Metanol e 1,2-dicloroetano	2	83	10	Borahan <i>et al.</i> (2019)
QuEChERS	Frutas	Acetonitrila	10	100	20	Varela-Martínez <i>et al.</i> (2019)
SPE	Frutas e vegetais	Acetonitrila e metanol	25	103	22	Sivaperumal <i>et al.</i> (2015)
QuEChERS	Tomate	Acetonitrila e ácido acético	10	≥ 93	10	Madureira (2012)
QuEChERS	Abacaxi	Acetonitrila e ácido acético	15	92	--	Morais (2013)
SFC	Batata	CO ₂ e metanol	17	77	--	Nunes <i>et al.</i> (2002)
LLE-LTP	Leite	Acetonitrila e ácido tricloroacético	5	≥ 70	--	Pereira (2018)
SPE	Água	2-propanol	0,6	≥ 96	--	Demir <i>et al.</i> (2020)
LLE-dSPE	Óleo	Acetonitrila	10	≥ 91	--	Fang <i>et al.</i> (2017)
SLE-LTP	Carne	Metanol	1	90	1	Este Trabalho

SFE: Extração com fluido supercrítico; VA-DLLME: Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por vórtex; SPE: Extração em fase sólida; LLE-LTP: Extração líquido-líquido por partição a baixa temperatura; LLE-dSPE: Extração líquido-líquido dispersiva com extração em fase sólida; SLE-LTP: Extração sólido-líquido por partição a baixa temperatura.

3.4. Análise das amostras de carne bovina

Estudo de adição e recuperação foram realizados com duas concentrações de propoxur $3,0 \times 10^{-5}$ e $1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em cinco amostras de carne bovina coletadas em pontos diferentes da cidade de Piracicaba - SP. Os resultados em porcentagens de recuperação são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Estudo de adição e recuperação do propoxur em amostras de carne bovina (n = 3)

Amostra	Concentração adicionada (mol L⁻¹)	Recuperação (%)
1	3,0 x 10 ⁻⁵	113,9 ± 1,1
	1,2 x 10 ⁻⁴	100,0 ± 1,4
2	3,0 x 10 ⁻⁵	128,4 ± 2,6
	1,2 x 10 ⁻⁴	111,1 ± 3,5
3	3,0 x 10 ⁻⁵	122,3 ± 0,6
	1,2 x 10 ⁻⁴	107,1 ± 0,7
4	3,0 x 10 ⁻⁵	117,2 ± 1,0
	1,2 x 10 ⁻⁴	111,9 ± 0,1
5	3,0 x 10 ⁻⁵	120,9 ± 0,6
	1,2 x 10 ⁻⁴	109,5 ± 0,1

As recuperações obtidas no estudo de adição e recuperação foram de 100 a 128% de propoxur, demonstrando a viabilidade do emprego da SLE-LTP em amostras de carnes bovina.

4. CONCLUSÃO

Uma metodologia rápida, prática, com baixo consumo de reagentes e geração de resíduos foi desenvolvida para determinação de propoxur em carne bovina. Trata-se de um procedimento de preparo de amostras que envolveu poucas etapas, o que minimizou os erros e também a probabilidade de perda do analito que poderia ocorrer devido a perda da amostra fortificada por excesso de manipulação da mesma durante o processo.

A metodologia proposta apresentou excelente precisão com coeficiente de variação igual a 0,66%. Durante o desenvolvimento do método, não foi observada a necessidade de implementação de um solvente secundário, pois o emprego de apenas um solvente extrator proporcionou excelente recuperação, o que pode ser observado no ensaio de adição e recuperação, com valores estimados entre 100 a 128%.

A massa de amostra necessária para condução do experimento é outra vantagem destacável do método. Enquanto demais métodos necessitam de quantidades de até 10 g de amostra para extração, para o método proposto a massa de 0,25 g foi suficiente para representar a amostra. Além da facilidade de manuseio, a pequena porção de amostra gera baixa quantidade de resíduos.

Comparando a SLE-LTP com outras técnicas de extração, o método proposto é fácil e de simples implementação para determinação de resíduos de propoxur em amostra de carne. Além disso, não há necessidade de *clean-up* da amostra, tornando o método mais vantajoso devido a rapidez de execução.

Além disso, pequenos volumes de solvente foram suficientes para extrair o analito. Com 1000 μL de solvente foi possível observar máxima interação do mesmo com a matriz, o que possibilitou recuperação estimada em torno de 100%. A mínima quantidade de solvente empregada é uma das vantagens, pois além da economia, há também a geração de baixos volumes de resíduos, estando em conformidade com os preceitos da química verde.

REFERÊNCIAS

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. **Números Do Rebanho Bovino Brasileiro 2018/2019**: 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/carne-bovina/2019/53a-ro/cenario-da-carne.pdf>. Acesso em: 13 out. 2020.

ACEVEDO, M. S. F.; LIMA, M. J. A.; NASCIMENTO, C. F.; ROCHA, F. R. P. *A green and cost-effective procedure for determination of anionic surfactants in milk with liquid-liquid microextraction and smartphone-based photometric detection*. **Microchemical Journal**, v. 143, p. 259-263, dez. 2018.

ALVAREZ-RIVERA, G.; BUENO, M.; BALLESTEROS-VIVAS, D.; MENDIOLA, J. A.; IBÁÑEZ, E. *Pressurized Liquid Extraction Liquid-Phase Extraction*, p. 375-398, 2020. Elsevier.

ANASTAS, P.; EGHBALI, N. *Green Chemistry: principles and practice*. **Chemical Society Reviews** v. 39, n. 1, p. 301-312, 2010. Royal Society of Chemistry (RSC).

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; TAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. *Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce*. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 1 mar. 2003. Oxford University Press (OUP).

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [online] disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117818/Perguntas+e+respostas.pdf/bc84279b-eff0-4edb-ad3a-0598d0>. Acessado em: 02 fev. 2020.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos#:~:text=O%20Programa%20de%20An%C3%A1lise%20de,chegam%20%C3%A0%20mesa%20do%20consumidor>. Acessado em 04 jun. 2021.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Índice monográfico P19 – Propoxur**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/p/4473json-file-1>. Acesso em 04 jun. 2021

ARAÚJO, E. A.; LARA, M. C. R.; REIS, M. R.; VIRIATO, R. L. S.; ROCHA, R. A. R.; GONÇALVES, R. G. L.; HELENO, F. F.; QUEIROZ, M. E. L. R.; TRONTO, J.; PINTO, F. G. *Determination of Haloxypfop-Methyl, Linuron, and Procymidone Pesticides in Carrot Using SLE-LTP Extraction and GC-MS*. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 5, p. 1344-1352, 23 set. 2015. Springer Science and Business Media LLC.

ARGAUER, R. J.; ELLER, K. I.; IBRAHIM, M. A.; BROWN, R. T. *Determining Propoxur and Other Carbamates in Meat Using HPLC Fluorescence and Gas Chromatography/Ion Trap Mass Spectrometry after Supercritical Fluid Extraction*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 10, p. 2774-2778, out. 1995. American Chemical Society (ACS).

ASSIS, C. R. D. **Caracterização da acetilcolinesterase cerebral do tambaqui (*Colossoma macropomum*) e efeito de pesticidas organofosforados e carbamatos sobre sua atividade**.

2008. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

BAROTTO, A. M. **Agrotóxicos - inseticidas**. [S.I]: Telessaúde - Santa Catarina. 44 slides, color. Disponível em:

<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/175519/Workshop%20sobre%20inseticidas.pdf?sequence=2&isAllowed=y>. Acesso em: 22 mar. 2021.

BARRETO, H. H. C.; INOMATA, O. N.; LEMES, V. R.R.; KUSSUMI, T. A.; SCORSFAVA, M. A.; ROCHA, S. O.B. Monitoramento de Resíduos de Pesticidas em Alimentos Comercializados no Estado de São Paulo em 1994. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 6, p. 2-11, 31 dez. 1996. Universidade Federal do Paraná.

BELPOGGI, F.; SOFFRITTI, M.; GUARINO, M.; LAMBERTINI, L.; CEVOLANI, D.; MALTONI, C. *Results of Long-Term Experimental Studies on the Carcinogenicity of Ethylene-bis-Dithiocarbamate (Mancozeb) in Rats*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 982, n. 1, p. 123-136, 24 jan. 2006. Wiley.

BENEDETTI, L. P. S. **Determinação *in situ* de analitos de interesse alimentício empregando tratamento de imagens digitais de *spot tests***. 2013. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

BORAHAN, T.; TEKIN, Z.; ZAMAN, B. T.; CHORMEY, D. S.; BAKIRDERE, S. *An analytical strategy for propoxur determination in raisin samples with matrix matching method after dispersive liquid-liquid microextraction*. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 84, p. 2-5, dez. 2019. Elsevier BV.

BOTELHO, B. G. **Desenvolvimento e validação de métodos para análise direta de alimentos usando ferramentas quimiométricas, espectroscopia no infravermelho e imagens digitais**. 2014. 136 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

BRASIL. **Instrução Normativa Nº 20, de 26 de julho de 2018**. Aprova o plano de amostragem e limites de referência para o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal - PNCRC de 2018 para as cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, equina, coelho, aves, avestruz, de leite, pescado, mel e ovos.

BRASIL. Ministério Da Saúde. **Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992**. Diretrizes e exigências referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins – nº 1, de 09 de dezembro de 1991. Diário Oficial da União, Brasília, DF.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

CALEB, J.; ALSHANA, U.; ERTAŞ, N. *Smartphone digital image colorimetry combined with solidification of floating organic drop-dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of iodate in table salt*. **Food Chemistry**, v. 336, jan. 2021. Elsevier BV.

CAVALCANTE, R. N. **Extração de antocianinas de resíduo de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) utilizando líquido pressurizado e fluido supercrítico: caracterização química,**

avaliação econômica e modelagem matemática. 2013. 235 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas, 2013.

COSTA, L. G. Propoxur. *Encyclopedia of Toxicology*, p. 1111-1112, 2014. Elsevier.

CHOI, L.; MCINTYRE, S.; FURNIVAL-ADAMS, J. *Indoor residual spraying for preventing malaria. Cochrane Database of Systematic Reviews*, p. 1-12, 30 mar. 2019. Wiley.

CHOODUM, A.; KESON, J.; KANATHARANA, P.; LIMSAKUL, W.; WONGNIRAMAIAKUL, W. *Selective pre and post blast trinitrotoluene detection with a novel ethylenediamine entrapped thin polymer film and digital image colorimetry. Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 252, p. 463-469, nov. 2017. Elsevier BV.

DAMACENO, M. A. **Desenvolvimento de método analítico empregando QuEChERS para a determinação simultânea de resíduos multiclasses de fármacos veterinários em pescados.** 2017. 42 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

DEMIR, Ö.; ULUSOY, H. İ.; ÖZER, E. T.; OSMAN, B. *Development of a new solid phase extraction method for sensitive determination of some carbamate pesticides in water using poly (EGDMA-MATrp) microbeads. Microchemical Journal*, v. 158, nov. 2020. Elsevier BV.

DONGHI, T. H., CALVERT, P.A.R.; EIDT, R. C. "Argentina". *Encyclopedia Britannica*, Jun. 2021. Disponível em: <https://www.britannica.com/place/Argentina>. Acesso em: 11 Jun 2021.

EPA - *United States Environmental Protection Agency. What the Pesticide Residue Limits are on Food / Pesticides.* Disponível em: www.epa.gov/pesticides/food/viewtols.htm = -. Acesso em: 12 nov. 2020.

EPA - *United States Environmental Protection Agency. Basics of Green Chemistry.* Disponível em: <https://www.epa.gov/greenchemistry/basics-green-chemistry#definition>. Acesso em: 12 nov. 2020.

EPA - *United States Environmental Protection Agency. Fact Sheet Reregistration Eligibility Decision (RED) Propoxur.* Disponível em:

<https://nepis.epa.gov/Exe/tiff2png.exe/200006EF.PNG?-r+75+-g+7+D%3A%5CZYFILES%5CINDEX%20DATA%5C95THRU99%5CTIFF%5C00000679%5C200006EF.TIF>. Acesso em: 14 jun 2021.

FANG, Y.; TIAN, W.; PEI, F.; LI, P.; SHAO, X.; FAN, Y.; HU, Q. *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, ago. 2017. Elsevier BV.

FAO - *Food and Agriculture Organization. Thailand country update report,* http://www.fao.org/fileadmin/templates/ess/documents/meetings_and_workshops/APCAS23/documents_OCT10/APCAS-10-11_-Thai_Ctry_report.doc - acessado em 11 jun 2021

FAO - *Food and Agriculture Organization. FAO Specifications and Evaluations for Agricultural Pesticides: propoxur 2-isopropoxyphenyl methylcarbamate. United State Of America.* FAO, 29 p.

FGV, Fundação Getúlio Vargas. **O Setor de Carnes no Brasil e suas Interações com o Comércio Internacional**. Disponível em:

https://gvagro.fgv.br/sites/gvagro.fgv.br/files/u115/03_Setor_Carnes_Brasil_PT.pdf. Acesso em: 14 jun. 2021.

FERREIRA, J. V. R.; PECKLE, B. A.; SILVA, A. S.; GOMES, A. S.; SANTANA, V. M.; DIREITO, I. C. N. Pesticidas aplicados na lavoura e o risco à saúde pública: uma revisão da literatura. *Três Poços, Cadernos UniFOA*, v. 9, n. 24, p. 87-103, 2014.

FILIPPIS, F. M. **Extração com CO₂ supercrítico de óleos essenciais de Hon-sho e Ho-sho: experimentos e modelagem**. 2001. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

FRANCO, M. O. K.; SUAREZ, W. T.; MAIA, M. V.; SANTOS, V. B. *Smartphone Application for Methanol Determination in Sugar Cane Spirits Employing Digital Image-Based Method*. *Food Analytical Methods*, v. 10, n. 6, p. 2102-2109, 29 dez. 2016. **Springer Science and Business Media LLC**.

FRIGGI, C. A. **Determinação multiclasse de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em carnes por LC-MS/MS**. 2012. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Santa Maria.

GANZLER, K.; SALGÓ, A.; VALKÓ, K. *Microwave extraction*. *Journal of Chromatography A*, v. 371, p. 299-306, dez. 1986. Elsevier BV.

GELADI, P.; WOLD, S.; ESBENSEN, K. *Image analysis and chemical information in images*. *Analytica Chimica Acta*, v. 191, p. 473-480, 1986. Elsevier BV.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. *Digital Image Processing*. 4. ed. Nova York: Pearson, 2018. 1306 p.

GOULART, A. C. **Otimização e aplicação da extração sólido líquido com partição a baixa temperatura para determinação de carbofurano em solo**. 2017. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Qualidade Ambiental, Meio Ambiente e Qualidade Ambiental, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

HERRERO, M.; MENDIOLA, J. A.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. *Supercritical fluid extraction: recent advances and applications*. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, n. 16, p. 2495-2511, abr. 2010. Elsevier BV.

HEMS, R. *Green chemistry is a field that looks at the sustainability of products and processes designed by people*. 2019. Disponível em: <https://letstalkscience.ca/educational-resources/stem-in-context/green-chemistry-101>. Acesso em: 09 jun. 2021.

HOU, X.; TANG, S.; WANG. *Recent advances and applications of graphene-based extraction materials in food safety*. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, v. 119, p.1-15, out. 2019. Elsevier BV.

JACQUES, R. A. **Caracterização química da erva mate (*Ilex paraguariensis*): aplicação de diferentes processos de extração e influência das condições de plantio sobre a composição química**. 2005. 158 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

JÄHNE, B. **Digital Image Processing**. 6. ed. Alemanha: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005. 621 p.

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

JOSHI, D. R.; ADHIKARI, N. *An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity*. **Journal of Pharmaceutical Research International**, p. 1-18, 29 jun. 2019. *Sciencedomain International*.

KAIPPER, B. I. A. **Desenvolvimento de métodos de extração e purificação para a determinação de pesticidas organofosforados em tomate por cromatografia**. 1998. 69 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1998.

KANG, H. S.; KIM, M.; KIM, E. J.; CHOE, W. *Determination of 66 pesticide residues in livestock products using QuEChERS and GC-MS/MS*. **Food Science and Biotechnology**, v. 29, n. 11, p. 1573-1586, 1 ago. 2020. *Springer Science and Business Media LLC*.

KRIGGER, S. P. **Obtenção e aplicação de microcápsulas de betalínas extraídas da pitaya vermelha como corante natural em iogurtes e avaliação da estabilidade através de imagens digitais**. 2019. 49 f. TCC (Graduação) - Curso de Graduação em Química Industrial, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

KUSSUMI, T. A. **Desenvolvimento de método multirresíduo para determinação de pesticidas benzimidazóis, carbamatos e triazinas em milho por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem e sua certificação**. 2007. 152 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares Autarquia Associada À Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

LANÇAS, F. M. Extração com fluido supercrítico: *quo vadis?* **Revista Analytica**, n. 2, p. 30-37, 2002.

LI, J.; ZU, Y.; FU, Y.; YANG, Y.; LI, S.; LI, Z.; WINK, M. *Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 4, p. 637-643, out. 2010. Elsevier BV.

LIANG, Y.; WANG, P.; WANG, H.; LONG, D.; SUN, Y.; WU, Y. *Time-Course Changes in Urine Metabolic Profiles of Rats Following 90-Day Exposure to Propoxur*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 18 nov. 2019. Springer Science and Business Media LLC

LIN, B.; YU, Y.; CAO, Y.; GUO, M.; ZHU, D.; DAI, J.; ZHENG, M. *Point-of-care testing for streptomycin based on aptamer recognizing and digital image colorimetry by smartphone*. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 100, p. 482-489, fev. 2018. Elsevier BV.

LINTHORST, J. A. *An overview: origins and development of green chemistry*. **Foundations of Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 55-68, 1 out. 2009. Springer Science and Business Media LLC.

MADUREIRA, F. D.; OLIVEIRA, F. A. S.; SOUZA, W. R.; PONTELO, A. P.; OLIVEIRA, M. L. G.; SILVA, G. *A multi-residue method for the determination of 90 pesticides in matrices with a high water*

content by LC-MS/MS without clean-up. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 29, n. 4, p. 665-678, Apr. 2012. Informa UK Limited.

MAĽTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. *Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues.* **Journal of Chromatography A**, v. 1040, n. 2, p.259-272, jun. 2004. Elsevier BV

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br>> acesso em novembro 2020.

MARQUES, S. R. R. **Microextração em fase sólida e cromatografia gasosa convencional e bidimensional para classificação de méis.** 2011. 179 f. Tese (Doutorado) Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

MELCHERT, W. R. **Desenvolvimento de procedimentos analíticos limpos e com alta sensibilidade para a determinação de espécies de interesse ambiental.** 2009. 187 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MENDOZA, M. P. G. **Aproveitamento do resíduo agroindustrial de juçara (*Euterpe edulis Mart.*): um estudo de diferentes técnicas de extração de compostos fenólicos e antocianinas usando altas pressões.** 2016. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas, 2016

MITRA, S. (ed.). **Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry.** New Jersey: John Wiley & Sons, 2003. 473 p.

MOEIN, M. M.; SAID, R.; BASSYOUNI, F.; ABDEL-REHIM, M. *Solid Phase Microextraction and Related Techniques for Drugs in Biological Samples.* **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2014, p. 1-24, 2014. Hindawi Limited.

MORAIS, C. S. **Validação intralaboratorial de Método multirresíduo para Determinação de Agrotóxicos em Abacaxi empregando QuEChERS e UPLC™- MS/MS.** 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimento, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2013.

MORAIS, E. H. C.; RODRIGUES, A. A. Z.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; MORAIS, P. H. D. *Determination of thiamethoxam, triadimenol and deltamethrin in pineapple using SLE-LTP extraction and gas chromatography.* **Food Control**, v. 42, p. 9-17, ago. 2014. Elsevier BV.

NERO, L. A.; R. MATTOS, M.; BELOTI, V.; A. F. BARROS, M.; PONTES NETTO, D.; G. M. FRANCO, B. D. Organofosforados e carbamatos no leite produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e ação sobre *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.* **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 27, núm. 1, enero-marzo, 2007, pp. 201-204 Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos Campinas, Brasil.

NOVÁKOVÁ, L.; VLČKOVÁ, H. *A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation.* **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1-2, p. 8-35, dez. 2009. Elsevier BV.

NUNES, G. S.; SANTOS, T. C. R.; BARCELÓ, D.; PIMENTA, A. S.; RIBEIRO, M. L. Extração por fluido supercrítico de alguns inseticidas carbamatos em amostras de batata, com determinação por HPLC/fluorescência e confirmação por HPLC/espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 214-220, maio 2002. FapUNIFESP (SciELO).

OECD/FAO (2020), **OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029**, OECD Publishing, Paris/FAO, Rome.

ONG, E.; WOO, S.; YONG, Y. *Pressurized liquid extraction of berberine and aristolochic acids in medicinal plants*. **Journal of Chromatography A**, v. 904, n. 1, p. 57-64, dez. 2000. Elsevier BV.

OSTEEN, C. *Pesticide Use Trends and Issues in the United States*. In: PIMENTEL, D.; LEHMAN, H.. **The Pesticide Question: environment, economics, and ethics**. Boston: Springer, 1993. Cap. 12. p. 307-336.

OUYANG, G.; JIANG, R. (ed.). **Solid Phase Microextraction: recent developments and applications**. Alemanha: 3, 2017.

PARIONA, A. **Top Pesticide Using Countries**. 2017. Disponível em: <https://www.worldatlas.com/articles/top-pesticide-consuming-countries-of-the-world.html>. Acesso em: 15 mar. 2021.

PAUMGARTTEN, F. J.R.. *Pesticides and public health in Brazil*. **Current Opinion In Toxicology**, v. 22, p. 7-11, ago. 2020. Elsevier BV.

PAWLISZYN, J. (ed.). **Handbook Of Solid Phase Microextraction**. Canada: Elsevier, 2012.

PAYÁ, P.; ANASTASSIADES, M.; MACK, D.; SIGALOVA, I.; TASDELEN, B.; OLIVA, J.; BARBA, A. *Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 6, p.1697-1714, 2 out. 2007. Springer Science and Business Media LLC.

PEREIRA, P. C. A. **Determinação de resíduos de medicamentos veterinários e agrotóxicos em leite cru refrigerado produzido na microrregião de Cacoal - Rondônia**. 2018. 75 f. Dissertação (Doutorado) – Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Universidade Federal de Rondônia, Rolim de Moura, 2018.

PICÓ, Y. *Pesticides and Herbicides: residue determination*. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 311-318, 2016. Elsevier.

PINTO, C. G.; LAESPADA, M. E. F.; MARTÍN, S. H.; FERREIRA, A. M. C.; PAVÓN, J. L. P.; CORDERO, B. M. *Simplified QuEChERS approach for the extraction of chlorinated compounds from soil samples*. **Talanta**, v. 81, n. 1-2, p. 385-391, 15 abr. 2010. Elsevier BV.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, [S.L.], v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009. FapUNIFESP (SciELO.)

PRESTES, O. D. **Método rápido para a determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal por LC-MS/MS.** Tese (Doutorado) – Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2011.

PubChem Compound Summary for CID 21584661, **N-Methylcarbamate.** <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Methylcarbamate>. Acesso em: 22 mar. 2021.

PubChem Compound Summary for CID 4944, **Propoxur.** <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propoxur>. Acesso em: 22 mar. 2021.

PUSSENTE, I. C. **Extração Sólido-Líquido e Partição em Baixa Temperatura (ESL-PBT) de Clorpirifós, Thiamethoxam e Deltametrina em Maçã e Análise por Cromatografia Gasosa.** 2008. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - Mg, 2008.

REICHARDT, C.; WELTON, T. ***Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry.*** 4. ed. Weinheim: Wiley-Vch Verlag Gmbh & Co. Kгаа, 2011. 711 p.

REIS, R. M. **Qualidade da carne bovina moída in natura comercializada em Manaus.** 2019. 88 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019.

RIBEIRO, L. G. **Extração Assistida por Micro-ondas de Óleo Essencial de Folhas de Eucalipto (*Eucalyptus urophylla x globulus*).** 2018. 118 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

ROSER, M. (2017) - "**Pesticides**". *Published online at OurWorldInData.org. Retrieved from: 'https://ourworldindata.org/pesticides' [Online Resource]*

SANTOS, J. C. **Extração com fluido supercrítico e suas aplicações na obtenção de produtos naturais.** 2011. 40 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

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*) Using Solid-Liquid Extraction with Low-Temperature Partitioning.* ***Journal of Chemistry***, v. 2018, p. 1-10, 1 nov. 2018. *Hindavi Limited.*

SARCINELLI, M. F.; VENTURINI, K. S.; SILVA, L. C. Características da Carne Bovina. **Boletim Técnico – PIE-UFES:00807.** Universidade Federal do Espírito Santo. Espírito Santo, 2007.

SAVOY, V. A. T. Classificação dos Agrotóxicos. **Biológico**, São Paulo, v.73, n.1, p.91-92, jan./jun., 2011.

SHAHBANDEH, M. ***Leading countries based on the production of milled rice in 2019/2020 (in million metric tons).*** 2021. Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/255945/top-countries-of-destination-for-us-rice-exports-2011/>. Acesso em: 11 jun. 2021.

SHARMA, A.; KUMAR, V.; SHAHZAD, B.; TANVEER, M.; SIDHU, G. P. S.; HANDA, N.; KOHLI, S. K.; YADAV, P.; BALI, A. S.; PARIHAR, R. D.. *Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem*. ***Sn Applied Sciences***, v. 1, n. 11, 21 out. 2019. Springer Science and Business Media LLC.

SIVAPERUMAL, P.; ANAND, P.; RIDDHI, L. *Rapid determination of pesticide residues in fruits and vegetables, using ultra-high-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry*. ***Food Chemistry***, v. 168, p. 356-365, fev. 2015. Elsevier BV.

SKOOG, D. A; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**, Editora Thomson, tradução da 8ª edição, 2006.

SOUSA-AGUIAR, E. F.; ALMEIDA, J. M. A. R.; ROMANO, P. N.; FERNANDES, R. P.; CARVALHO, Y. *GREEN CHEMISTRY: the evolution of a concept*. ***Química Nova***, p. 1257-1261, 2014. GN1 Genesis Network.

VARELA-MARTÍNEZ, D. A.; GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á.; GONZÁLEZ-SÁLAMO, J.; HERNÁNDEZ-BORGES, J. *Analysis of multiclass pesticides in dried fruits using QuEChERS-gas chromatography tandem mass spectrometry*. ***Food Chemistry***, v. 297, nov. 2019. Elsevier BV.

YOSHIMURA, K. *Ion-exchanger colorimetry—I Micro determination of chromium, iron, copper and cobalt in water*. ***Talanta***, v. 23, n. 6, p. 449-454, jun. 1976. Elsevier BV.

ZAFIROPOULOS A; TSAROUHAS, K; TSITSIMPIKOU, C; FRAGKIADAKI, P; GERMANAKIS, I; TSARDI, M; MARAVGAKIS, G; GOUTZOURELAS, N; VASILAKI, F; KOURETAS, D. *Cardiotoxicity in rabbits after a low-level exposure to diazinon, propoxur, and chlorpyrifos*. ***Human & Experimental Toxicology***, v. 33, n. 12, p. 1241-1252, 12 maio 2014. SAGE Publications.