



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

EDSON LUÍS DA SILVA

**SOLVENTE SUPRAMOLECULAR PARA  
PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE PROTIOCONAZOL EM  
AMOSTRAS DE ÁGUA E DETERMINAÇÃO POR  
CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

---

Londrina  
2024

EDSON LUÍS DA SILVA

**SOLVENTE SUPRAMOLECULAR PARA  
PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE PROTIOCONAZOL EM  
AMOSTRAS DE ÁGUA E DETERMINAÇÃO POR  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Trabalho de Dissertação apresentado à  
Universidade Estadual de Londrina - UEL,  
como requisito para a obtenção do título de  
Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. César Ricardo Teixeira  
Tarley

Londrina  
2024

Silva, Edson Luis da.

SOLVENTE SUPRAMOLECULAR PARA PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE PROTIOCONAZOL EM AMOSTRAS DE ÁGUA E DETERMINAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA / Edson Luis da Silva. - Londrina, 2024.  
62 f.

Orientador: César Ricardo Teixeira Tarley.  
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2024.  
Inclui bibliografia.

1. Agrotóxicos - Tese. 2. Protioconazol - Tese. 3. Microextração por solvente supramolecular - Tese. 4. Cromatografia líquida - Tese. I. Tarley, César Ricardo Teixeira. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

EDSON LUÍS DA SILVA

**SOLVENTE SUPRAMOLECULAR PARA  
PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE PROTIOCONAZOL EM  
AMOSTRAS DE ÁGUA E DETERMINAÇÃO POR  
CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Trabalho de Dissertação apresentado à  
Universidade Estadual de Londrina - UEL,  
como requisito para a obtenção do título de  
Mestre em Química.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Orientador César Ricardo Teixeira Tarley  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Luiza Zeraik  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Altair Benedito Moreira  
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Londrina, 27 de setembro de 2024.

*Dedico esse trabalho aos meus pais, José e Vanilda.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador, Professor Tarley, pela oportunidade de trabalharmos juntos por esses 3 anos, por todos os ensinamentos práticos e teóricos que tive nesse período para execução desse trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade de cursar mestrado. A Universidade Estadual de Londrina por fornecer educação pública de qualidade.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação, por todos os ensinamentos, dedicação e exemplos de amor a profissão.

Ao grupo de pesquisa LADEMA pelas amizades e parcerias construídas nos 3 anos de pesquisa. A Luciane Effting, pelos trabalhos realizados juntos e por todas as conversas durante esse período, aos meus colegas Isabela de Almeida e Pedro Angelis que além de companheiros de trabalho, participamos do mestrado juntos.

A empresa ADAMA Brasil S.A, por todo o suporte, desde a liberação para cursar as disciplinas, mas também por todo suporte analítico para a execução deste projeto.

A minha esposa Kellem por sua compreensão e incentivo para que eu retornasse aos estudos depois tantos anos afastados, e por todo o amor e dedicação a nossa família. Ao meu filho Lucas, que me inspira diariamente a ser uma pessoa melhor.

Ao meu irmão Marco, por ser a pessoa em quem sempre me espelhei desde a criança e ser esse irmão que posso contar sempre.

Aos meus pais, José e Vanilda, a quem dedico essa tese, que desde criança me incentivaram a estudar e que nunca mediram esforços para realização de todos os meus sonhos.

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora Auxiliadora, que em muitas vezes eu pedi força para continuar a caminhada, e por sempre me amparar, mesmo nos momentos mais difíceis.

## RESUMO

SILVA, Edson Luís. **Solvente supramolecular para pré-concentração de protioconazol em amostras de água e determinação por cromatografia líquida de alta eficiência.** 2024. 62 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

A utilização de agrotóxicos para controle de pragas e doenças, visando aumentar a produtividade agrícola está cada vez mais presente atualmente. No entanto, o emprego excessivo e inadequado desses produtos químicos tem gerado preocupação global em relação aos impactos ao meio ambiente e na saúde humana. Dentro da indústria de produção de agrotóxicos, existem regulamentações que estabelecem limites máximos para a presença desses compostos em água. Adicionalmente, órgãos regulamentadores no Brasil, como a ANVISA (Agência de Vigilância Sanitária) e CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), preconizam limites máximos de agrotóxicos em águas potáveis e águas naturais, respectivamente. Para formulações utilizando protioconazol, há carência de legislação. O protioconazol é um fungicida que recentemente vem sendo produzido no Brasil e é utilizado na cultura de soja para controle da ferrugem asiática. Por ser um agrotóxico recentemente comercializado no Brasil, ainda não há legislação quanto aos limites máximos em corpos d'água. Portanto, o desenvolvimento de métodos analíticos que atendam essa demanda é de grande importância. Ressalta-se que dentre os poucos métodos reportados para microextração de protioconazol, os encontrados na literatura foram microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e microextração líquido-líquido com emulsificação (ELLME). Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de pré-concentração de protioconazol em amostras de água utilizando microextração por solvente supramolecular (SUPRAS) baseado em 1-decanol e tetraidrofurano (THF). O método foi otimizado utilizando um planejamento fatorial fracionário  $2^{5-1}$  com 16 ensaios, incluindo um ponto central. A partir da avaliação do diagrama de Pareto, as melhores condições determinadas para a microextração de protioconazol foram identificadas: volume de 40,0 mL de água em pH 4,00, 500,0  $\mu\text{L}$  de 1-decanol, 750,0  $\mu\text{L}$  de THF, 30 segundos de agitação em vortex e centrifugação a 4000 rpm por 3 minutos. O método de microextração destaca-se por apresentar um fator de pré-concentração de 71 vezes, permitindo atingir os limites de detecção e quantificação de 4,2 e 14,1  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente, sem a necessidade de utilizar a cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas. De acordo com os resultados das análises, não foi detectado protioconazol nas amostras de água da bacia de contenção e do Rio Ribeirão Lindóia.

**Palavras-chave:** Agrotóxicos, protioconazol, microextração por solvente supramolecular, 1-decanol, amostras de água e cromatografia líquida.

## ABSTRACT

SILVA, Edson Luís. **Supramolecular solvent for prothioconazole pre-concentration in water samples and determination by high performance liquid chromatography**. 2024. 62 p. Dissertation (Master in Analytical Chemistry) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

The use of pesticides for pest and disease control, aiming to increase agricultural productivity, is becoming increasingly prevalent. However, the excessive use and inappropriate application of pesticides have raised concerns among the global population regarding the environment and human health. In industries that produce pesticides, legislation sets maximum limits on water. Additionally, regulatory agencies in Brazil, such as ANVISA (National Health Surveillance Agency) and CONAMA (National Environment Council), mandate maximum pesticide limits in drinking water and natural waters, respectively. However, no legislation exists for new formulations using prothioconazole, a fungicide recently produced in Brazil and used in soybean cultivation to control Asian rust. Therefore, developing analytical methods that meet this demand is paramount. It is worth noting that among the few methods reported for prothioconazole microextraction, those found in the literature were dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and liquid-liquid microextraction with emulsification (ELLME). Thus, this work aimed to develop a pre-concentration method for prothioconazole in water samples using a supramolecular solvent (SUPRAS) based on 1-decanol and tetrahydrofuran (THF). The process was optimized using a  $2^{5-1}$  fractional factorial design with 16 trials, including a central point. From the analysis of the Pareto diagram, the best conditions determined for prothioconazole microextraction were identified: 40.0 mL of water at pH 4.00, 500.0  $\mu\text{L}$  of 1-decanol, 750.0  $\mu\text{L}$  of THF, 30 seconds of vortexing and centrifugation at 4000 rpm for 3 minutes. The microextraction method stands out for presenting a pre-concentration factor of 71 times, allowing the detection and quantification limits of 4.2 and 14.1  $\mu\text{g L}^{-1}$  to be reached without the use liquid chromatography coupled with a mass spectrometer. According to the analysis results, no prothioconazole was detected in the water samples from the containment basin and the Ribeirão Lindóia River.

**Keywords:** Pesticides, prothioconazole, supramolecular solvent microextraction, 1-decanol, water samples and liquid chromatography

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> Fórmula estrutural do Protioconazol.....   | 25 |
| <b>Figura 2:</b> Representação esquemática da microextração utilizando solvente supramolecular.....   | 32 |
| <b>Figura 3:</b> Diferentes técnicas de HPLC utilizadas dependem do log Kow da molécula do analito.....   | 36 |
| <b>Figura 4:</b> Espectro de absorção do protioconazol na região de ultravioleta.....   | 37 |
| <b>Figura 5:</b> Cromatograma representativo da análise cromatográfica dos agrotóxicos picoxistrobina, protioconazol e tebuconazol na proporção da fase móvel 90:10 % (v/v) de acetonitrila/água acidificada com ácido fórmico 0,1 % (v/v) respectivamente.....   | 38 |
| <b>Figura 6:</b> Cromatograma representativo da análise cromatográfica dos agrotóxicos picoxistrobina, protioconazol e tebuconazol na proporção da fase móvel 80:20 % (v/v) de acetonitrila/água acidificada com ácido fórmico 0,1 % (v/v) respectivamente.....   | 38 |
| <b>Figura 7:</b> Cromatograma representativo da análise cromatográfica dos agrotóxicos picoxistrobina, protioconazol e tebuconazol na proporção da fase móvel 70:30 % (v/v) de acetonitrila / água acidificada com ácido fórmico 0,1 % (v/v) respectivamente.....   | 39 |
| <b>Figura 8:</b> Gráfico do diagrama de Pareto.....   | 41 |
| <b>Figura 9:</b> Distribuição das espécies de protioconazol em relação ao pH.....   | 42 |
| <b>Figura 10:</b> Cromatograma representativo da análise da água da bacia de contenção obtido tanto para a amostra não fortificada quanto para a amostra fortificada com a concentração de 100 µg L <sup>-1</sup> de protioconazol, as amostras foram submetidas as seguintes condições, volume de amostra 40,0 mL de água em pH 4,00, 500,0 µL de 1-decanol, 750,0 µL de THF, 30 segundos de tempo de vortex e 3 minutos de centrifugação com rotação de 4000 rpm..... | 44 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 11:</b> Cromatograma representativo do ensaio de seletividade de uma amostra água de alto grau de pureza contendo os fungicidas protioconazol, picoxistrobina e tebuconazol com concentração de 100 µg L <sup>-1</sup> , a amostra foi submetida as seguintes condições, volume de amostra 40,0 mL de água em pH 4,00, 500,0 µL de 1-decanol, 750,0 µL de THF, 30 segundos de tempo de vortex e 3 minutos de centrifugação com rotação de 4000 rpm. ....         | 45 |
| <b>Figura 12:</b> Gráfico da faixa linear de trabalho de protioconazol em 7 níveis de concentração com etapa de pré-concentração (14,3 – 477,2 µg L <sup>-1</sup> ) e sem etapa de pré-concentração (1234 – 31597 µg L <sup>-1</sup> ). ....   | 46 |
| <b>Figura 13:</b> Cromatograma representativo da análise da água da bacia de contenção obtido tanto para a amostra não fortificada quanto para a amostra fortificada com a concentração de 100 µg L <sup>-1</sup> de protioconazol, as amostras foram submetidas as seguintes condições, volume de amostra 40,0 mL de água em pH 4,00, 500,0 µL de 1-decanol, 750,0 µL de THF, 30 segundos de tempo de vortex e 3 minutos de centrifugação com rotação de 4000 rpm. ....   | 49 |
| <b>Figura 14:</b> Cromatograma representativo da análise da água do rio Ribeirão Lindóia obtido tanto para a amostra não fortificada quanto para a amostra fortificada com a concentração de 100 µg L <sup>-1</sup> de protioconazol, as amostras foram submetidas as seguintes condições, volume de amostra 40,0 mL de água em pH 4,00, 500,0 µL de 1-decanol, 750,0 µL de THF, 30 segundos de tempo de vortex e 3 minutos de centrifugação com rotação de 4000 rpm. .... | 49 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1:</b> Valores das variáveis e níveis codificados do planejamento fatorial fracionário $2^{5-1}$ .....                               | 33 |
| <b>Tabela 2:</b> Faixa de valores preconizados como adequados para os parâmetros .....   | 39 |
| <b>Tabela 3:</b> Matriz e resultados do planejamento fatorial fracionário $2^{5-1}$ .....  | 40 |
| <b>Tabela 4:</b> Fator de pré-concentração, faixa linear de trabalho, limite de detecção e quantificação do método. ....                       | 47 |
| <b>Tabela 5:</b> Precisão intradia do método de análise de protioconazol. ....   | 47 |
| <b>Tabela 6:</b> Precisão interdica do método de análise de protioconazol. ....  | 47 |
| <b>Tabela 7:</b> Resultados da exatidão de protioconazol nas amostras de água do Rio Ribeirão Lindóia e Bacia de Contenção. ....               | 48 |
| <b>Tabela 8:</b> Comparação dos métodos da literatura e do presente método para a determinação protioconazol com detecção por HPLC-UV-DAD..... | 51 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|        |  |
|--------|--|
| ACN    | Acetonitrila   |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária   |
| AOAC   | Association of Official Analytical Collaboration (Associação de Colaboração Analítica Oficial)     |
| BPA    | Boas Práticas Agrícolas  |
| CONAMA | Conselho Nacional do Meio Ambiente   |
| DDT    | Diclorodifeniltricloroetano  |
| DLLME  | Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (Microextração Líquido-Líquido Dispersiva)                |
| DPR    | Desvio Padrão Relativo   |
| ELLME  | Emulsified Liquid-Liquid Microextraction (Microextração Líquido-Líquido com Emulsificação)         |
| FEPAM  | Fundação Estadual de Proteção Ambiental  |
| FPC    | Fator de Pré-Concentração  |
| CPE    | Cloud Point Extraction (Extração no Ponto Nuvem)   |
| GC     | Gas Chromatography (Cromatografia Gasosa)  |
| HPLC   | High-Performance Liquid Chromatography) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)                  |
| DAD    | Diode Array Detector (Detector de Arranjo de Diodos)   |
| IBAMA  | Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis                           |
| IUPAC  | International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada) |
| LD     | Limite de Detecção   |
| LLE    | Liquid-Liquid Extraction (Extração Líquido-Líquido)  |
| LQ     | Limite de Quantificação  |
| MAPA   | Ministério da Agricultura e Pecuária   |
| n      | Número de Replicatas   |
| NaCl   | Cloreto de Sódio   |
| ODS    | Objetivo de Desenvolvimento Sustentável  |
| ONU    | Organização das Nações Unidas  |

|                |   |
|----------------|---|
| pH             | Potencial Hidrogeniônico  |
| pKa            | Constante de Dissociação Ácida  |
| PTZ            | Protioconazol   |
| PTZ-d          | Protioconazol-destio  |
| R <sup>2</sup> | Coefficiente de Regressão   |
| SPE            | Solid Phase Extraction (Extração em Fase Sólida)  |
| SUPRAS         | Microextração por Solvente Supramolecular   |
| THF            | Tetraidrofurano   |
| UHPLC          | Ultra-High-Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência) |
| UV             | Ultravioleta  |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 15 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....                                       | 20 |
| 2.1 Recursos Hídricos.....  | 20 |
| 2.2 Agrotóxicos .....   | 22 |
| 2.3 Protioconazol .....   | 25 |
| 2.4 Microextração .....   | 26 |
| 2.5 Solvente Supramolecular .....                                   | 28 |
| 3. OBJETIVO .....   | 29 |
| 3.1 Objetivo Principal .....  | 29 |
| 3.2 Objetivos Específicos.....                                      | 29 |
| 4. PARTE EXPERIMENTAL.....  | 30 |
| 4.1 Reagentes e Preparo de Soluções .....                           | 30 |
| 4.2 Equipamentos Utilizados.....                                    | 30 |
| 4.3 Procedimento de Microextração com Solvente Supramolecular ..... | 31 |
| 4.4 Otimização do Procedimento de Microextração Supramolecular..... | 33 |
| 4.5 Determinação dos Parâmetros Analíticos .....                    | 33 |
| 4.6 Coleta e Preservação de Amostras.....                           | 34 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                     | 35 |
| 5.1 Desenvolvimento de Método por HPLC .....                        | 35 |
| 5.2 Otimização do Método Supramolecular .....                       | 40 |
| 5.3 Parâmetros Analíticos .....                                     | 44 |
| 5.4 Aplicação em Amostras de Água .....                             | 48 |
| 6. CONCLUSÃO .....  | 52 |
| REFERÊNCIAS.....  | 53 |

## 1. INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos são compostos químicos desenvolvidos para interromper os processos biológicos essenciais para sobrevivência dos insetos, microrganismos, animais e plantas, com o objetivo de controlá-los ou eliminá-los. No entanto, muitos desses processos biológicos são comuns em todos os seres vivos, o que significa que os efeitos desses produtos podem impactar não apenas os organismos alvo, mas também a outros seres do ambiente (1).

Os agrotóxicos desempenham um papel importante na agricultura moderna na proteção das lavouras contra pragas e doenças. O uso dos agrotóxicos diminui a quantidade ervas daninha nas lavouras, evitando a necessidade de controle manual, permitindo que os agricultores reduzam os custos de produção e aumentem a lucratividade dos negócios (2).

Embora esses produtos ofereçam vários benefícios, seu uso também pode representar sérios riscos à saúde humana e ambiental. Os resíduos de agrotóxicos contaminam o solo, corpos d'água, ar e afetam organismos não-alvo, como insetos benéficos, pássaros e vida aquática (2). Estima-se que aproximadamente 10% dos agrotóxicos aplicados na agricultura atingem áreas não-alvo, especialmente ao longo das divisas das propriedades agrícolas, essa porcentagem pode ainda ser maiores se chover logo após aplicação dos agrotóxicos (3).

A presença de agrotóxicos nos ecossistemas tem efeitos adversos que variam com a concentração, quantidade e tempo de exposição (3). Além disso, alguns agrotóxicos são considerados tóxicos porque persistem no meio ambiente e se acumulam nos organismos vivos (3,4).

A contaminação de corpos d'água por agrotóxicos pode ser atribuída às práticas agrícolas, resíduos urbanos e despejo de efluentes sem tratamento adequado pelas indústrias de agrotóxicos. Sabe-se que, da quantidade aplicada de agrotóxicos, apenas uma pequena parte atua no controle de pragas e doenças. A maior parte acaba contaminando o solo e atingindo os corpos d'água pela deriva da pulverização aérea ou terrestre, escoamento e lixiviação (5).

Os agrotóxicos são compostos químicos utilizados na agricultura com objetivo de aumentar a produção agrícola, reduzindo os danos causados por pragas às plantações. O problema com pragas e doenças nas culturas, teria causado uma redução de 30 – 40% na produtividade agrícola mundial se os agrotóxicos não

fossem utilizados na agricultura. Em 2021, a quantidade total de agrotóxicos utilizados globalmente na agricultura foi de cerca de 3,54 milhões de toneladas. A colheita antes do período recomendado pelo fabricante do agrotóxico é uma das grandes preocupações para a segurança alimentar, devido à presença de resíduos de agrotóxicos nos alimentos. Assim, o monitoramento desses resíduos em alimentos é muito importante de modo a garantir a segurança alimentar (6).

Para controle de resíduos de agrotóxicos em produtos agrícolas, os pesquisadores estão atualmente utilizando uma variedade de métodos analíticos. A determinação de agrotóxicos é baseada principalmente em técnicas cromatográficas, em destaque estão a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-High Performance Liquid Chromatography) e cromatografia gasosa (GC – Gas Chromatography) (5,7).

A cromatografia líquida de alta eficiência e a cromatografia gasosa são as técnicas mais utilizadas para determinação de agrotóxicos em diferentes tipos de matrizes. No entanto, quando combinadas com a espectrometria de massas, essas técnicas permitem análises de baixa concentração sem a necessidade de um processo de extração. Porém, para a aquisição desses equipamentos é necessários grandes investimentos e que nem sempre é possível. Uma alternativa viável para análises de resíduos é a utilização da cromatografia líquida ou cromatografia gasosa, utilizando técnicas de extração e pré-concentração com objetivo de aumentar a sensibilidade dos métodos analíticos (8).

Ao longo dos anos várias técnicas de extração foram desenvolvidas para limpeza e pré-concentração de agrotóxicos em amostras alimentares e ambientais, como por exemplo: Extração líquido-líquido (LLE- Liquid Liquid Extraction) e extração em fase sólida (SPE- Solid Phase Extraction) (5).

A extração líquido-líquido é amplamente empregada no preparo de amostra antes de uma análise instrumental a fim de reduzir a complexidade das matrizes e aumentar a sensibilidade dos métodos analíticos. Porém, esta técnica consome grandes quantidades de solventes orgânicos, que são caros e de alta toxicidade, além disso, é um método demorado e que gera uma grande quantidade de resíduos prejudiciais ao meio ambiente (9,10).

A extração em fase sólida é muito utilizada para limpeza e pré-concentração de analitos. Embora a SPE apresente vantagens em relação às outras técnicas de extração, devido à quantidade de materiais sorventes com várias

características de sorção, porém, a técnica também apresenta algumas limitações. Por exemplo, é um processo demorado, que possui várias etapas, envolvendo lavagem e condicionamento, carregamento de amostra, eluição e secagem do cartucho de extração, além de consumir grande quantidade de solventes orgânicos (11,12).

Em razão da grande quantidade de análises dos laboratórios, estudos estão sendo realizados para diminuir o tempo de análises, abrangendo todas as etapas do processo, desde a preparação da amostra até análise dos dados. A preparação de amostra é uma etapa importante no fluxo de trabalho, particularmente ao trabalhar com matrizes complexas em amostras ambientais e biológicas. O preparo de amostra desempenha um papel importante na redução da complexidade da amostra e geralmente é a etapa mais demorada do processo, respondendo por aproximadamente 60% do tempo total necessário para todo o trabalho analítico (13).

Na busca por métodos de extração mais simples, rápidos e com menor consumo de solventes orgânicos e ao mesmo tempo minimizando os impactos ambientais, técnicas miniaturizadas de preparo de amostras foram desenvolvidas seguindo os princípios da química verde utilizando solventes ecológicos, esses solventes possuem baixa toxicidade ao meio ambiente e não são inflamáveis (14).

Estas técnicas miniaturizadas de extração são baseadas no equilíbrio e requerem pequenas quantidades de solvente orgânico e amostra. Atualmente, existem várias técnicas de extração, como por exemplo: microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME–Dispersive Liquid-Liquid Microextraction) e solventes supramoleculares (SUPRAS) (14,15).

A DLLME é vista como uma versão em escala miniaturizada da extração líquido-líquido utilizando pequenas quantidades de solvente. Este método tem atraído o interesse entre os pesquisadores devido à sua simplicidade, baixo custo, capacidade de pré-concentração do analito, além de não requerer grandes quantidades de solventes tóxicos (16). Os solventes extratores utilizados na DLLME são orgânicos e mais pesados que a água, tais como hidrocarbonetos clorados e a maioria desses solventes são altamente tóxicos. Os solventes dispersantes (acetona acetonitrila ou metanol) que são utilizados em DLLME, com objetivo de aumentar a solubilidade dos analitos, muitas vezes podem reduzir a eficiência da extração. Portanto, é necessário encontrar um solvente de extração sustentável para eliminar o uso de solventes e de dispersantes tóxicos (15).

A microextração baseada em solventes supramoleculares foi desenvolvida como uma alternativa sustentável a outras técnicas de extração. SUPRAS é um líquido imiscível em água formado por processo sequencial de automontagem de líquidos nanoestruturados, gerados a partir de moléculas anfifílicas (17). Os solventes supramoleculares são compostos orgânicos que surgem como uma alternativa aos solventes orgânicos tradicionais, esse solvente é formado através da reação espontânea de agregados de micelas reversas à base de um álcool de cadeia longa dispersos na mistura de tetraidrofurano e água (18).

O SUPRAS interage com moléculas de diversas polaridades, o que permite uma alta eficiência nos processos de extração, utilizando baixos volumes de solventes extratores. Essa característica permite ao SUPRAS uma excelente capacidade de dissolver, concentrar e realizar extrações específicas, além de diminuir o tempo de extração devido à grande área superficial entre o analito e o solvente (19,20). Comparado a outros solventes orgânicos, o solvente supramolecular apresenta características vantajosas, como baixa pressão de vapor, estabilidade térmica, alta capacidade de solubilização dos analitos e compatibilidade com a maioria dos equipamentos analíticos (15).

A otimização dos métodos analíticos vem evoluindo nos últimos anos e a utilização de técnicas multivariadas exploratórias está se tornando indispensável na otimização de processos industriais, síntese orgânica e laboratórios de pesquisas. As análises multivariadas estão substituindo os processos univariados, sendo que as principais características desta metodologia é avaliar simultaneamente a influência de todas as variáveis que serão otimizadas em um experimento. Esse tipo de planejamento é importante para economizar recursos, tempo e custos, ao mesmo tempo em que fornece informações importantes sobre as variáveis que mais afetam o processo ou o resultado do experimento (21).

Um planejamento experimental tem como objetivo encontrar as melhores condições de análises para um determinado experimento. No desenvolvimento de metodologias analíticas, diversos fatores podem influenciar no seu desempenho, por isso, é importante realizar a otimização dos parâmetros experimentais, a fim de aumentar resposta dos métodos analíticos (22).

De acordo com o exposto nesse trabalho, um método de pré-concentração de protioconazol foi desenvolvido utilizando solvente supramolecular à base de 1-decanol e tetraidrofurano, visando o monitoramento de amostras de água. A Fundação Estadual de Proteção Ambiental (Fepam), responsável pela emissão de licenças ambientais no estado do Rio Grande do Sul, definiu o limite de  $300 \mu\text{g L}^{-1}$  para o protioconazol em água. Com base nesse critério, o método de microextração utilizando solvente supramolecular foi otimizado.

Após revisão da literatura, foram encontrados poucos estudos de microextração de protioconazol em água. As técnicas utilizadas nessas pesquisas foram microextração líquido-líquido dispersiva e microextração líquido-líquido com emulsificação (ELLME-Emulsification Liquid-Liquid Microextraction) (23,24).

Nesse trabalho utilizou-se da técnica de microextração com solvente supramolecular para pré-concentração de protioconazol em água. O método desenvolvido mostrou-se uma excelente alternativa para microextração de protioconazol, pois é um método fácil e com poucas etapas de preparo de amostra, utiliza-se de baixos volumes de solvente extrator e de amostra, gerando assim pequenas quantidades de resíduos. Quando comparado com o método DLLME descrito na literatura, o SUPRAS se destaca por ser mais rápido, já que não requer etapa de aquecimento da amostra. Isso é uma vantagem significativa, pois evita riscos à integridade do analista ao manusear amostras aquecidas. Além disso, o método proposto permite a análise direta da amostra, sem a necessidade de diluição em solvente orgânico.

O método SUPRA e ELLME descritos na literatura apresentam vantagens em relação ao DLLME, destacando-se pela simplicidade e rapidez. No entanto, uma desvantagem do ELLME é o baixo fator de pré-concentração, que é de apenas 23 vezes. Enquanto o método proposto possui um fator de pré-concentração de 71 vezes, permitindo análises de baixa concentração por meio da cromatografia líquida, sem a necessidade de estarem acoplados em espectrômetros de massas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

### 2.1 RECURSOS HÍDRICOS

Em 2018 as áreas urbanas representavam 55% da população total e deverá aumentar para 68% até 2050. Portanto, garantir a qualidade da água potável é importante para a saúde pública e o desenvolvimento dos países. O sexto objetivo de desenvolvimento sustentável ODS 6, um dos 17 objetivos de desenvolvimento sustentável estabelecidos pelas Organização das Nações Unidas (ONU) em 2015, tem como objetivo garantir o acesso à água e ao saneamento até 2030. O ODS 6.1 visa disponibilizar água potável e com preços acessíveis para todos, referindo-se especificamente a "água potável segura e acessível" (UN-Water, 2017) (25).

Garantir os recursos hídricos e alimentares é fundamental para atingir os objetivos de desenvolvimento sustentável de 2030, particularmente o ODS 6 (água potável e saneamento) e ODS 2 (fome zero). Espera-se que a população urbana que enfrente escassez de água duplique de 930 milhões em 2016 para 1,7 e 2,4 bilhões até 2050. A previsão é que aproximadamente 670 milhões de pessoas, que corresponde a cerca de 8% da população global, enfrentem escassez contínua de alimentos até 2030 (26).

Os reflexos das mudanças climáticas são visíveis no mundo inteiro, afetando diretamente os recursos hídricos. Alterações da temperatura média do ar e da quantidade de chuva estão prejudicando a qualidade desse recurso tão importante para a nossa vida e para os ecossistemas (27).

Nas últimas três décadas, a mudança climática está afetando o funcionamento saudável dos ecossistemas e a conservação da biodiversidade natural. Reconhecida e comprovada pelo protocolo de Kyoto na década de 1990, a mudança climática representa uma ameaça a diversidade ecológica, fertilidade do solo, segurança alimentar, disponibilidade de água e da própria existência humana (28).

Com a urbanização e o crescimento populacional que passaram a acontecer sobre as nascentes e áreas de mananciais, degradando e contaminando as águas. Portanto, prevenir a completa deterioração dos ecossistemas, particularmente nas proximidades de água costeiras, que são ambientes altamente expostos à presença de contaminantes se tornou inevitável (29). Vários países da Ásia e da África estão

enfrentando sérios problemas com a poluição das águas, devido ao aumento da densidade populacional. No Quênia, por exemplo, apenas 20% do país possui água disponível de forma adequada, a maior parte da água do país é captada em barragens ou extraída do solo (30).

Quando o processo de contaminação ultrapassa a capacidade dos ecossistemas de absorvê-lo, os efeitos ficam ainda mais evidentes no meio ambiente. Os impactos ambientais podem ser observados pelo excesso de poluentes, baixas concentrações de oxigênio, redução da riqueza e diminuição da quantidade de peixes, entre outras espécies mais sensíveis a contaminação (29).

Com o desenvolvimento econômico dos países emergentes, aumenta a demanda por água para processos industriais, produção de energia e desenvolvimento de infraestrutura. Esse aumento precisa ser equilibrado para manter os fluxos ambientais e proteger ecossistemas aquáticos. Nos últimos anos, modelos hidrológicos como, por exemplo, Machine Learning (ML) foi desenvolvido para fornecer informações de como os recursos hídricos podem ser alocados de forma eficiente e sustentável para apoiar o crescimento econômico sem comprometer a saúde ecológica (31).

Numa escala global, a exploração dos recursos hídricos precisa ser gerida de forma mais eficiente. Um aspecto importante na gestão de recursos é fornecer aos gestores de recursos hídricos ferramentas para ajudar nas tomadas de decisões, a fim de planejar as possíveis deficiências na administração, garantindo assim o uso sustentável desses recursos naturais (31).

Globalmente, as águas subterrâneas fornecem cerca de 36% da água potável e 43% da água agrícola. Porém, sua qualidade está cada vez mais ameaçada devido à extração excessiva, à poluição e aos efeitos das mudanças climáticas. Estima-se que as águas residuais não tratadas, contaminação agrícola e poluição industrial poluem quase 20% dos aquíferos subterrâneos do mundo. Traços de metais, agrotóxicos, cloretos, nitratos e micróbios estão entre os principais poluentes das águas subterrâneas doces. A contaminação da água subterrânea ameaça à saúde global e a produção de alimentos, especialmente em locais áridos como a Arábia Saudita (32).

Os desafios de segurança hídrica e alimentar são mais intensos em regiões áridas devido à escassez de recursos renováveis de água doce, o que impacta tanto a produção agrícola quanto o desenvolvimento econômico. A Arábia Saudita serve como um bom exemplo de um país seco que enfrenta escassez de água devido a pouca quantidade de chuva e um ambiente desértico. Estas condições resultam em uma dependência de águas subterrâneas não renováveis e de água do mar dessalinizada para atender às demandas humanas e agrícolas. Contudo, a exploração insustentável de águas subterrâneas foi além da quantidade de reposição natural, resultando na destruição do aquífero. Para resolver a questão da segurança hídrica, águas residuais de vários setores estão sendo tratadas com objetivo de diminuir a falta de água na maioria das regiões ao redor do mundo (32).

## 2.2 AGROTÓXICOS

O Brasil se destaca pela capacidade de produção de alimentos e abastecimento da população mundial. Não basta produzir em quantidade, mas também em qualidade e segurança, atendendo as diversas normas nacionais e internacionais (33).

Os agrotóxicos são substâncias químicas ou biológicas utilizadas na proteção de cultivos para aumentar o rendimento e a qualidade das lavouras, sua aplicação na agricultura resulta em inúmeros benefícios. O uso de agrotóxicos ajuda a proteger as plantações de pragas como fungos, insetos e plantas daninhas que possam causar danos à plantação (34).

“A definição geral do termo agrotóxico pode ser encontrada na Lei nº 7.802, em que o termo agrotóxico e afim é descrito como produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso no setor de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas, como também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, assim como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (35)”.

O uso de agrotóxicos na agricultura tem sido amplamente benéfico, porém o manejo inadequado desses produtos pode resultar em uma quantidade elevada de resíduos de agrotóxicos em produtos agrícolas, representando um potencial risco para a saúde dos consumidores. Mesmo quando aplicados conforme as Boas Práticas Agrícolas (BPA), os agrotóxicos podem deixar resíduos nos alimentos. Portanto, é necessário seguir à dosagem do produto conforme indicado no rótulo do produto e aplicar conforme a recomendação do fabricante (33).

As Boas Práticas Agrícolas é um conceito elaborado pelos serviços oficiais de sanidade agropecuária e segurança alimentar. A BPA refere-se a um conjunto de princípios, normas e recomendações técnicas aplicáveis às diversas etapas da produção agrícola, para garantir a produção de alimentos saudáveis e seguros para consumo. O principal objetivo é proteger as plantas contra pragas e doenças e ainda controlar os resíduos de agrotóxicos, visando assegurar proteção da saúde dos consumidores, trabalhadores e acesso aos mercados internacionais (36).

As Boas Práticas Agrícolas são fundamentais para assegurar uma agricultura sustentável e responsável, contribuindo para a produção de alimentos seguros e com o controle de resíduos de agrotóxicos no meio ambiente.

Os resíduos de agrotóxicos devem estar em conformidade com os Limites Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos pelas normas nacionais e internacionais (37,38).

Os Limites Máximos de Resíduos são os níveis permitidos de resíduos de agrotóxicos que podem estar presentes em alimentos e produtos agrícolas destinados ao consumo humano. Esses LMR são estabelecidos por normas regulatórias tanto em níveis nacionais quanto internacionais. Os limites são definidos com base em avaliações de segurança alimentar e toxicológicas para assegurar que os alimentos contenham níveis seguros e aceitáveis de resíduos de agrotóxicos, minimizando assim os riscos para a saúde (37,38).

Para obtenção de registro no Brasil, o agrotóxico deve passar pela avaliação de três órgãos do governo federal: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Cada um desses órgãos conduz uma avaliação específica do produto, de modo independente um do outro. O IBAMA é responsável pela realização de um dossiê ambiental, no qual é avaliado o potencial poluidor do produto. Ao Mapa é atribuída a

responsabilidade de avaliar a eficiência e o potencial de uso na agricultura, por meio de um dossiê agrônômico. Já a ANVISA analisa o dossiê toxicológico, avaliando o quão tóxico é o produto para a população e em quais condições o seu uso é seguro. Depois da avaliação dos processos de registros, o órgão responsável por fornecer o registro de agrotóxicos no Brasil é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (39).

Os agrotóxicos são amplamente utilizados na produção agrícola, mas sua baixa solubilidade em água limita sua aplicação. Por isso, foram desenvolvidas formulações específicas para o controle de pragas e doenças. No entanto, estas formulações tradicionais contêm solventes orgânicos que são voláteis e altamente tóxicos (40).

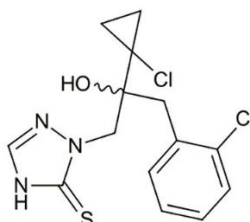
Para enfrentar esses desafios, formulações estão sendo desenvolvidas encapsulando o ingrediente ativo em uma matriz ecológica, biocompatível e biodegradável para produzir uma formulação de liberação controlada. Essa formulação vem ganhando a atenção em resposta à segurança humana e às preocupações ambientais em torno do uso de agrotóxico (41).

Atualmente, as nanoemulsões (NEs) estão sendo utilizados no desenvolvimento de sistemas eficientes de liberação de fármacos e conservação de alimentos. Alguns estudos já relataram a aplicação de NEs no desenvolvimento de formulações de agrotóxicos com baixa toxicidade e estabilidade de armazenamento, visando reduzir seus custos e melhorar a segurança dos agrotóxicos. Portanto, novas formulações ecologicamente corretas precisam ser desenvolvidas para enfrentar os desafios atuais, ao mesmo tempo garantindo a segurança e a eficiência da produção agrícola (40).

### 2.3 PROTIOCONAZOL

O protioconazol é um eficiente fungicida utilizado mundialmente. Os agrotóxicos têm sido fundamentais para agricultura global, contribuindo significativamente para o aumento da produção agrícola (42,43).

**Figura 1:** Fórmula estrutural do Protioconazol.



**Fonte:** IUPAC.

Os fungicidas triazólicos, a segunda classe mais importante de fungicidas e ganharam atenção nos últimos anos (42). O protioconazol (2-[(2RS)-2-(1-clorociclopropil)-3-(2-clorofenil)-2-hidroxiopropil]-2H-1,2,4-triazol-3(4H)-tiona) é um agente altamente eficaz no controle de doenças fúngicas de diversas culturas (44).

O protioconazol já foi registrado em mais de 60 países e em 2014 se tornou um dos fungicidas mais comercializados globalmente, com US\$ 855 milhões em vendas. Na China, o protioconazol foi registrado e comercializado pela primeira vez em janeiro de 2019. O protioconazol este entre os principais produtos do produzidos pela empresa Bayer Group (42).

O protioconazol é uma triazolintiona sistêmica de amplo espectro fungicida que vem sendo aplicado por pulverização foliar no mundo todo (44,45). Pertence ao grupo do inibidor de desmetilação Sterol 14 $\alpha$  (DMI). Em fungos, o protioconazol interfere na síntese do ergosterol inibindo a atividade do CYP51, que catalisa a desmetilação em C14 do lanosterol ou 2,4-metileno diidrolanosterol, levando à disfunção da membrana celular fúngica (45,46).

Com o aumento da produção e comercialização de protioconazol, os impactos ambientais e toxicológicos passaram a receber mais atenção, devido à contaminação da água, a biodiversidade e a saúde humana (42,47).

A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) mostraram que o protioconazol tem efeitos reprodutivos e toxicidade no desenvolvimento. Além disso, o protioconazol pode induzir toxicidade cardiovascular em larvas de *Zebrafish*. Na verdade, o protioconazol é rapidamente transformado no seu metabolito quiral protioconazol-destio. A degradação de protioconazol em protioconazol-destio (PTZ-d) foi investigada em arroz nas províncias de Anhui, Hubei e Guangdong e observou que a quantidade inicial de protioconazol-destio foi 0,152 – 0,545 mg kg<sup>-1</sup> (48).

Durante as chuvas uma quantidade de protioconazol aplicado atinge o solo e cerca de 60% de PTZ é convertido em protioconazol-destio. O PTZ-d representa um grande risco à segurança ecológica, pois é mais solúvel do que o PTZ em água e possui tempo de meia-vida superior a 20 dias no solo. (49).

O protioconazol é um composto quiral que possui dois enantiômeros, chamados (R)-protioconazol e (S)-protioconazol. A determinação e identificação desse fungicida é realizada por HPLC ou Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (UHPLC-Ultra-High-Performance Liquid Chromatography), utilizando detector de arranjo de diodos ou espectrometria de massas (23,24,50).

A análise dos enantiômeros do protioconazol é realizada por cromatografia quiral, utilizando uma coluna cromatográfica com fase estacionária quiral. Sob essas condições, é possível separar e quantificar individualmente cada enantiômero do protioconazol (23,24), sendo que a mistura dos enantiômeros pode ser determinada por cromatografia em fase reversa utilizando coluna cromatográfica com fase estacionária C<sub>18</sub> (50).

## 2.4 MICROEXTRAÇÃO

A química analítica verde é um conceito emergente de desenvolvimento sustentável. Os métodos analíticos considerados verdes são desenvolvidos utilizando materiais seguros, baixo consumo de energia e menor geração de resíduos, mas mantendo a eficiência do processo de extração (14,51).

Os métodos de extração são geralmente voltados para um preparo de amostra miniaturizada e simplificado utilizando solventes ecológicos. Do ponto de vista da química verde, os solventes têm um lugar estratégico no processo de microextração. Um solvente verde deve atender aos requisitos básicos, como disponibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, reciclabilidade e não inflamável (14).

A microextração em fase líquida foi proposta pela primeira vez em 1996, e foi desenvolvida com objetivo de superar as desvantagens da extração líquido-líquido, como o consumo de grandes quantidades de substâncias potencialmente tóxicas, solventes orgânicos caros, temperatura e tempo de realização das etapas do processo de extração (51).

Na LPME, apenas alguns microlitros de solvente são necessários para extração dos analitos, o processo de extração ocorre entre uma pequena quantidade de solvente imiscível em água e uma fase aquosa contendo o analito de interesse, diferente da LLE que consome grande quantidade de solvente orgânico tóxico. Além disso, a LPME é um método mais rápido, ecologicamente correto e mais simples (11,15).

As técnicas de microextração em fase líquida permitem a purificação e a pré-concentração de matrizes complexas. Inicialmente, as técnicas de LPME eram aplicadas principalmente em amostras de água. Atualmente, a técnica já é aplicada em amostra mais complexas, incluindo ambientais, clínicas, biológicas, alimentares, produtos naturais, vegetais, ervas e farmacêuticos, já foram relatados (52).

Nos últimos anos, houve um avanço nas técnicas de microextração em fase líquida, onde novas técnicas foram desenvolvidas incluindo microextração líquido-líquido dispersiva, microextração à base de ferrofluido, microextração utilizando solventes supramoleculares e microextração líquido-líquido assistida por vórtice (52).

Essas técnicas de microextração são frequentemente utilizadas em conjunto com cromatografia gasosa ou cromatografia líquida de alta eficiência para análise quantitativa e qualitativa de analitos em amostras complexas, como água, alimentos, solos e produtos biológicos. Elas oferecem vantagens como alta sensibilidade, baixo consumo de solventes e amostras, e maior eficiência na separação e análise dos analitos.

## 2.5 SOLVENTE SUPRAMOLECULAR

O termo solvente supramolecular vem sendo utilizado para se referir a líquidos nanoestruturados formados por moléculas anfífilas através de um processo sequencial de automontagem. Esse processo ocorre em duas escalas, molecular e nano resultando na formação de líquidos que são imiscíveis em água (53).

Métodos de extração em escala miniaturizadas são importantes no processo de microextração de compostos, além de permitir a extração e pré-concentração dos analitos, esses métodos oferecem várias vantagens como a redução do uso de solventes tóxicos e a minimização de possíveis interferentes na amostra (54).

Nos últimos anos, os SUPRAS vêm recebendo grande atenção entre os pesquisadores, devido às suas propriedades e aplicações únicas na química analítica. Os SUPRAS são considerados alternativas mais ecológicas aos solventes orgânicos tradicionais utilizados nos métodos de extração LLE para pré-concentração de amostra antes das análises cromatográficas (55).

Os agregados tridimensionais formados por esses solventes podem interagir com as moléculas, por ligações de hidrogênio, cátion  $\pi$ , dipolo-dipolo, mecanismos interativos iônicos e hidrofóbicos com o analito (56).

Os ácidos decanóico e octanóico são os precursores mais utilizados para a formação de SUPRAS, são imiscíveis em água, mas dissolvem-se facilmente em tetraidrofurano, resultando na formação de agregados de micelas reversas (57). A característica das estruturas ordenadas do SUPRAS, resulta em um solvente capaz extrair analitos em uma ampla faixa de polaridade utilizando pequenas quantidades de solvente extrator (18,58).

SUPRAS é considerada uma técnica híbrida de microextração líquido-líquido, pois utiliza moléculas anfífilas como meio de extração e um agente dispersor, da mesma forma do ponto nuvem (CPE- Cloud Point Extraction). No entanto, SUPRAS se destaca em relação ao método de extração em CPE, uma vez que geralmente esta técnica precisa de temperatura para favorecer o processo de extração. Porém, devido ao longo tempo de aquecimento, pode ocorrer uma diminuição na eficiência do processo de extração, quando comparado ao LLE, o SUPRAS é considerado ambientalmente mais correto, pois não utiliza solventes tóxicos no método de extração (58).

Métodos de extração baseados em SUPRAS podem ser desenvolvidos com base em processos sintéticos sem energia através dos quais são obtidas moléculas anfifílicas consideradas verdes, de baixo custo e disponíveis comercialmente. Todas essas características tornam o SUPRAS acessível e ideal para implementar processos mais seguros, sustentáveis e econômicos (59).

A aplicação eficiente do SUPRAS como um método de microextração depende da otimização de suas variáveis que desempenham um papel importante no processo de extração, incluindo a quantidade de molécula anfifílica (extrator), tetraidrofurano (agente dispersor), água e pH da amostra, que são dependentes uns dos outros (58).

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1 OBJETIVO PRINCIPAL**

Desenvolver um método de pré-concentração de protioconazol em amostras de água, que se enquadra no conceito de Química Limpa, baseado em solvente supramolecular.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Otimizar os fatores que influenciam na pré-concentração do pesticida protioconazol com solvente supramolecular utilizando um planejamento fatorial fracionário  $2^{5-1}$ ;
- ✓ Validar o método empregando análises por cromatografia líquida para determinação do protioconazol em água;
- ✓ Demonstrar aplicabilidade do método validado na determinação do protioconazol em amostras de água.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 REAGENTES E PREPARO DE SOLUÇÕES

Os reagentes utilizados nas análises foram de grau HPLC e PA. A água ultrapura foi obtida a partir de um sistema de purificação MILLI-Q®Direct 8 (Darmstadt, Alemanha) com resistividade 18,2 MΩ cm e filtradas em filtro de teflon® 0,45 µm. Os reagentes e solventes utilizados foram, acetonitrila (ACN, ≥ 99,9%) pela J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, Estados Unidos), tetraidrofurano (THF) (≥ 99,9%) pela Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA), 1-decanol (≥ 98,0%) pela Spectrum Chemical MfgCorp (New Brunswick, NJ, Estados Unidos), ácido fórmico (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pela LABSYTH (Diadema, SP, Brasil), ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pela Nuclear (CQA - Diadema, SP, Brasil), ácido clorídrico (HCl) pela Química Moderna (Barueri, SP, Brasil) e cloreto de sódio (NaCl), pela Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA). O padrão analítico de protioconazol foi adquirido da Dr. Ehrenstorfer™ (Augsburg, Alemanha).

A solução de protioconazol foi preparada em acetonitrila e armazenada em frascos âmbar e mantidas sob refrigeração. As soluções de trabalho foram preparadas a partir da solução estoque e diluídas em água ultrapura para realização dos experimentos.

### 4.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

As medidas de pH foram determinadas no pHmetro digital do laboratório Digimed DM-22, equipado com um eletrodo de vidro DME-CV2 com sensor de temperatura integrado (Campo Grande, SP, Brasil). A agitação em vortex foi realizada com o oscilador de vortexGenie 2, Modelo SI-0256 (Bohemia, NY, EUA) e a centrifugação na centrífuga KASVI - Modelo K14 - 4000 (São José dos Pinhais, PR, Brasil), a pesagem na balança analítica Mettler Toledo - Modelo MS 205DU (Columbus, OH, Estados Unidos), HandyStep® touch S e pipeta automática, BRAND, (Wertheim, Alemanha), Incubadora B.O.D Tecnal, modelo TE 371 (Piracicaba, SP, Brasil) e vidrarias calibradas com certificação RBC.

A análise cromatográfica foi realizada utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-UV-DAD) modelo 1260 Infinity II, Agilent Technologies (Santa Clara, Estados Unidos), coluna cromatográfica Eclipse Plus C<sub>18</sub>, Part Number, 959993-902, (250 mm de comprimento x 4.6 mm de diâmetro interno x 5 µm tamanho de partícula), volume de injeção 5 µL, temperatura do compartimento de coluna foi 25 °C, comprimento de onda de 256 nm, tempo de retenção de 6,0 minutos e fluxo de fase móvel 1,0 mL min<sup>-1</sup>. A fase móvel foi constituída de acetonitrila e ácido fórmico 0,1 % (v/v) na razão 70:30 % numa eluição isocrática. A aquisição dos dados foi realizada pelo software OpenLab da empresa Agilent Technologies.

#### 4.3 PROCEDIMENTO DE MICROEXTRAÇÃO COM SOLVENTE SUPRAMOLECULAR

O método analítico para microextração do protioconazol em água utilizando SUPRAS está demonstrado na Figura 2. Em tubo cônico de 50 mL, foram adicionados volumes de 500 µL de 1-decanol e 750 µL de THF. Os solventes foram agitados e, em seguida, foram adicionados 40,0 mL de solução aquosa de protioconazol a pH 4,0. A mistura foi agitada por vortex por 30 segundos para facilitar o processo de pré-concentração e, então, submetida à centrifugação a 4000 rpm durante 3 minutos para completar a separação do solvente supramolecular. Com uma micropipeta, a fase contendo o analito de interesse foi coletada, transferida para frascos e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência HPLC-UV-DAD.

**Figura 2:** Representação esquemática da microextração utilizando solvente supramolecular.



500 µL de 1-Decanol  
+ 750 µL de TFH



500 µL de 1-Decanol  
+ 750 µL de TFH  
+ 40 mL de amostra



30 Segundos de Vortex



Centrifugação à 4000 rpm por  
3,0 minutos



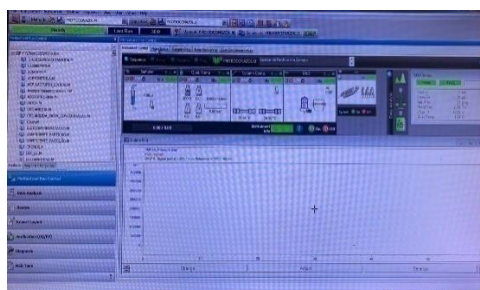
Fase rica com analito  
protioconazol



Amostra no vial para  
análise



+



Análise por HPLC/DAD acoplado a sistema de aquisição de dados OpenLab ChemStation.

**Fonte:** Autoria própria.

#### 4.4 OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE MICROEXTRAÇÃO SUPRAMOLECULAR

A microextração e pré-concentração de protoconazol utilizando o método supramolecular foi otimizada por meio de um planejamento fatorial fracionário  $2^{5-1}$  e as seguintes variáveis foram avaliadas: pH da solução, volume do solvente extrator 1-decanol, volume do solvente dispersor THF, influência do sal e tempo de vórtex. Para esse experimento, foi fixado o volume de 40,0 mL de solução de protoconazol na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . Os níveis inferiores, superiores e ponto central estão descritos na Tabela 1. Os experimentos foram realizados em duplicata.

**Tabela 1:** Valores das variáveis e níveis codificados do planejamento fatorial fracionário  $2^{5-1}$ .

| Variáveis                   | Níveis |       |       |
|-----------------------------|--------|-------|-------|
|                             | (-)    | 0     | (+)   |
| pH                          | 4      | 6     | 8     |
| 1-decanol ( $\mu\text{L}$ ) | 500    | 750   | 1000  |
| THF ( $\mu\text{L}$ )       | 750    | 1000  | 1250  |
| NaCl % (m/v)                | 0,0 %  | 3,0 % | 6,0 % |
| Vórtex (min)                | 0,5    | 2,0   | 3,5   |

**Fonte:** Autoria própria.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS

Os parâmetros analíticos avaliados foram: seletividade, faixa linear de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, fator de pré-concentração, precisão inter e intradia e exatidão por adição de padrão (54,60).

O fator de pré-concentração foi determinado para avaliar a eficiência do processo de microextração. Para isso, foram construídas duas curvas analíticas, sem e com pré-concentração, o fator de pré-concentração do método foi calculado pela razão do coeficiente angular das duas curvas analíticas com e sem etapa de pré-concentração, esse cálculo permite determinar o ganho de sensibilidade obtido pela pré-concentração dos analitos (54).

Os limites de detecção e quantificação foram determinados usando a equação da reta obtida a partir de três curvas analíticas, cada uma com sete níveis de concentração e análises em triplicata. Esses limites foram calculados de acordo com o guia da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) RDC N° 166. Os cálculos para determinação do limite de detecção e quantificação baseiam-se a partir do desvio padrão ( $\sigma$ ) do intercepto com o eixo Y, dividido pela inclinação da curva de calibração (IC) os cálculos foram realizados conforme a Equação 1 e Equação 2 (60).

$$\frac{LD = 3,3 \cdot \sigma}{IC} \quad \text{Equação 1}$$

$$\frac{LQ = 10 \cdot \sigma}{IC} \quad \text{Equação 2}$$

As precisões inter e intradia foram determinadas em dois níveis concentrações  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $325 \mu\text{g L}^{-1}$  e ( $n=10$ ). Os ensaios foram realizados de acordo com a (CIPAC-Collaborative International Pesticides Analytical Council).

Os desvios padrão relativos (DPR, %) foram calculados para determinar a precisão do método analítico.

#### 4.6 COLETA E PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS

Amostras de água para determinação de protioconazol foram coletadas na bacia de contenção na unidade de indústria, localizada na cidade de Taquari/RS (coordenadas: -29.812332959247378, -51.84015868285132), e do Rio Ribeirão Lindóia localizada na cidade de Londrina/PR (coordenadas: -23.276849861066466, -51.10622418465583). Devido uma das amostras ter sido coletada na cidade de Taquari/RS, essa foi filtrada em membrana para remover partículas em suspensão. O pH foi ajustado para 4,00 utilizando ácido sulfúrico e a amostra foi armazenada em caixa térmica com gelo seco para o transporte até o laboratório em Londrina / PR.

A amostragem da água do rio Ribeirão Lindóia ocorreu em duas etapas: a primeira foi realizada a aproximadamente 30 cm da superfície da lâmina d'água do rio, enquanto a segunda foi coletada a uma profundidade de cerca de 30 cm da considerada superficial. As amostras de água foram armazenadas em caixa térmica com gelo (61).

Ambas as amostras coletadas foram armazenadas em frascos de vidro âmbar para protegê-las da luz (61).

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

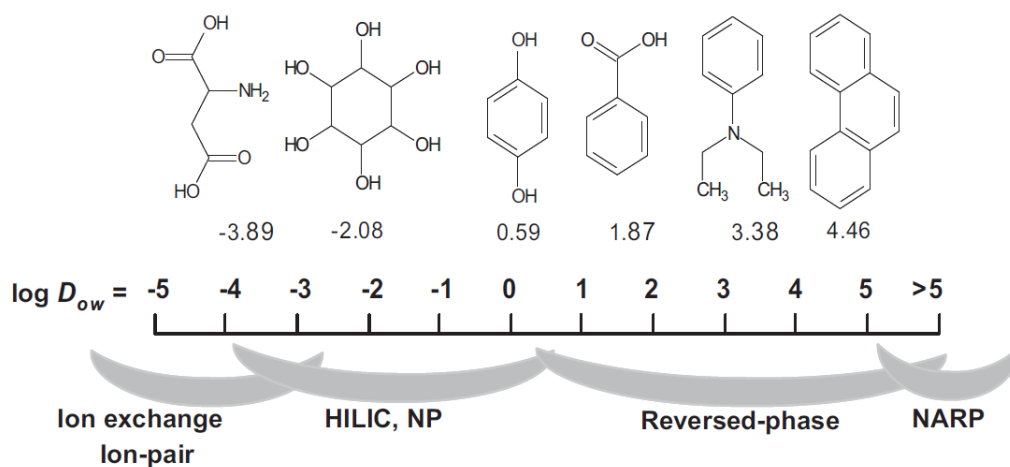
### **5.1 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR HPLC**

Um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido para determinação de protioconazol em amostras de água da bacia de contenção. Como essas amostras de água podem conter picoxistrobina e tebuconazol como possíveis interferentes, a metodologia analítica foi desenvolvida para que esses dois fungicidas não interferissem na análise de protioconazol.

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma das principais ferramentas da química analítica, com capacidade de separar, identificar e quantificar compostos orgânicos presentes em amostras, sendo a técnica analítica mais amplamente utilizada para análises qualitativas e quantitativas (62,63).

A seleção da coluna e a fase estacionária é a etapa mais importante no desenvolvimento do método, a coluna é selecionada pelas características do analito (62,63). Nesse desenvolvimento, foi utilizada uma coluna de fase estacionária C<sub>18</sub> devido ao protioconazol ter um log P 2,0, de maneira geral, na cromatografia em fase reversa, tanto a escolha da coluna cromatográfica quanto da fase móvel é baseado no log P do analito conforme descrito na Figura 3 (64,65).

**Figura 3:** Diferentes técnicas de HPLC utilizadas dependem do log Kow da molécula do analito.



**Fonte:** Moldoveanu e David, (2013, p 468)

A fase móvel desempenha um papel importante na separação em fase reversa, pois afeta sua resolução, seletividade e eficiência. A acetonitrila é um solvente comumente utilizado em fase reversa devido ao seu baixo valor de absorção (UV 190 nm), baixa viscosidade, além de ser um solvente miscível em água. A mistura de acetonitrila e água é a melhor escolha inicial para a fase móvel durante desenvolvimento de método (62,66). Portanto, nesse desenvolvimento foi utilizado acetonitrila como solvente de eluição.

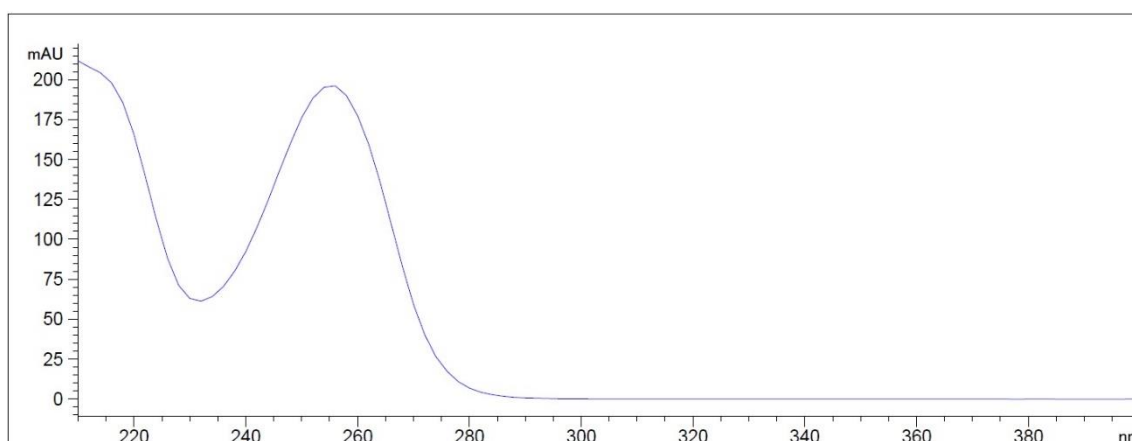
A solução do ácido fórmico a 0,1% (v/v) foi utilizada devido ao protioconazol ser uma molécula ionizável, com uma constante de dissociação (pKa) de 6,9. Portanto, a solução ácida foi preparada para que o pH da solução esteja com 2 unidades menores que o pKa do protioconazol, o qual é um princípio dos métodos desenvolvidos por cromatografia em fase reversa (65).

O volume de injeção foi determinado com base na especificação da coluna cromatográfica utilizada nesse desenvolvimento, pois não é recomendado que se injete um volume de amostra maior que 1 % do volume da coluna vazia, garantindo, assim, uma maior eficiência da coluna cromatográfica. Portanto, o volume de injeção selecionado para a metodologia analítica foi de 5  $\mu$ L (67).

O fluxo de 1 mL  $\text{min}^{-1}$  foi selecionado de acordo com dimensões da coluna cromatográfica de 250 mm de comprimento x 4.6 mm de diâmetro interno x 5  $\mu$ m tamanho de partícula (68).

O comprimento de onda foi selecionado em 256 nm, pois é a região do espectro de UV que o protioconazol possui maior absorção conforme apresentado na Figura 4, a seleção adequada do comprimento de onda proporciona um aumento do sinal analítico, melhorando a sensibilidade do método, e conseqüentemente diminuindo os limites de detecção e quantificação da metodologia analítica (65,69).

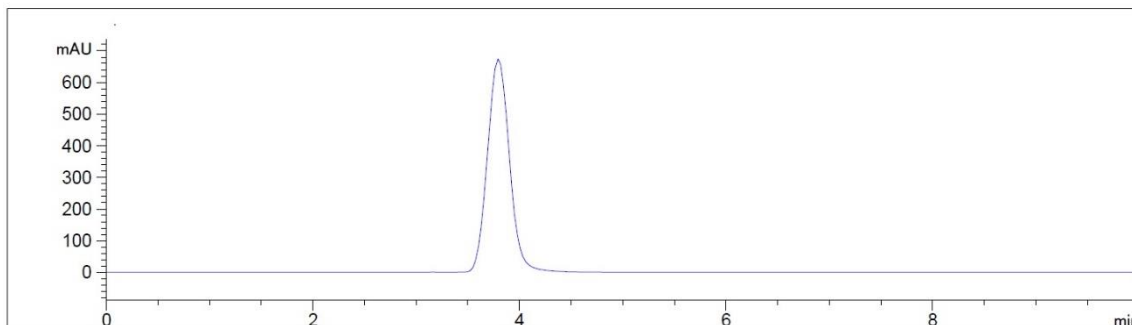
**Figura 4:** Espectro de absorção do protioconazol na região de ultravioleta.



**Fonte:** Extraída do Software operacional OpenLab®.

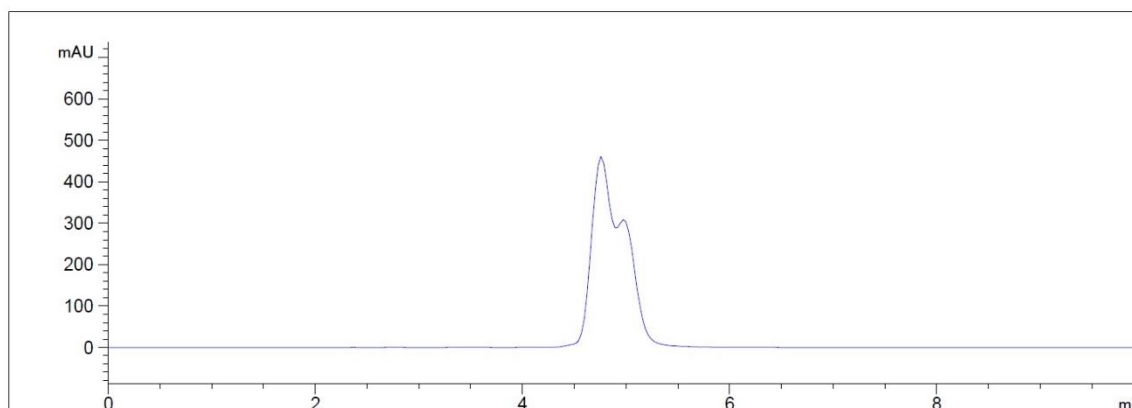
A proporção dos solventes da fase móvel acetonitrila grau HPLC e a solução de ácido fórmico 0,1 % (v/v) foi otimizada para análise de protioconazol e dos possíveis interferentes picoxistrobina e tebuconazol. As figuras 5, 6 e 7 apresentam a proporção da fase móvel que foram testadas nesse desenvolvimento de método.

**Figura 5:** Cromatograma representativo da análise cromatográfica dos agrotóxicos picoxistrobina, protioconazol e tebuconazol na proporção da fase móvel 90:10 % (v/v) de acetonitrila/água acidificada com ácido fórmico 0,1 % (v/v) respectivamente.



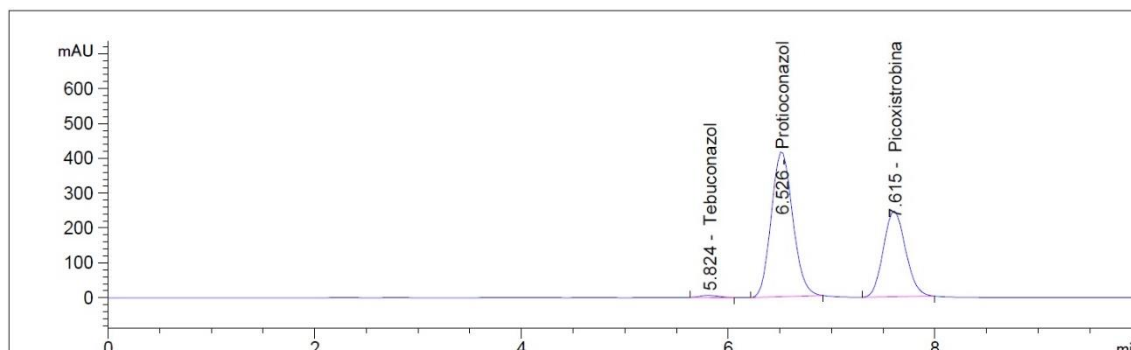
**Fonte:** Extraída do Software operacional OpenLab®.

**Figura 6:** Cromatograma representativo da análise cromatográfica dos agrotóxicos picoxistrobina, protioconazol e tebuconazol na proporção da fase móvel 80:20 % (v/v) de acetonitrila/água acidificada com ácido fórmico 0,1 % (v/v) respectivamente.



**Fonte:** Extraída do Software operacional OpenLab®.

**Figura 7:** Cromatograma representativo da análise cromatográfica dos agrotóxicos picoxistrobina, protioconazol e tebuconazol na proporção da fase móvel 70:30 % (v/v) de acetonitrila / água acidificada com ácido fórmico 0,1 % (v/v) respectivamente.



**Fonte:** Extraída do Software operacional OpenLab®.

O desempenho do método analítico foi avaliado pelos valores calculados de fator de retenção, resolução, simetria do pico cromatográfico.

**Tabela 2:** Faixa de valores preconizados como adequados para os parâmetros cromatográficos.

| Parâmetros                    | Condição Adequada | Valores calculados |
|-------------------------------|-------------------|--------------------|
| Fator de capacidade (K)       | > 2               | > 2,1              |
| Resolução (Rs)                | Rs > 2            | Rs > 4,0           |
| Número de pratos teóricos (N) | N > 2000          | N > 15000          |
| Simetria do pico              | 0,8 – 1,8         | 0,9                |

**Fonte:** Autoria própria.

A Tabela 2 apresenta os parâmetros avaliados no desenvolvimento do método analítico. Os resultados obtidos para cada parâmetro foram considerados aceitáveis, pois estão dentro da faixa recomendada descrita na literatura (70,71).

Após a definição dos parâmetros cromatográficos, o método analítico de pré-concentração com solvente supramolecular para determinação de protioconazol em água foi validado conforme o documento orientativo da ANVISA para validação de métodos cromatográficos.

## 5.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO SUPRAMOLECULAR

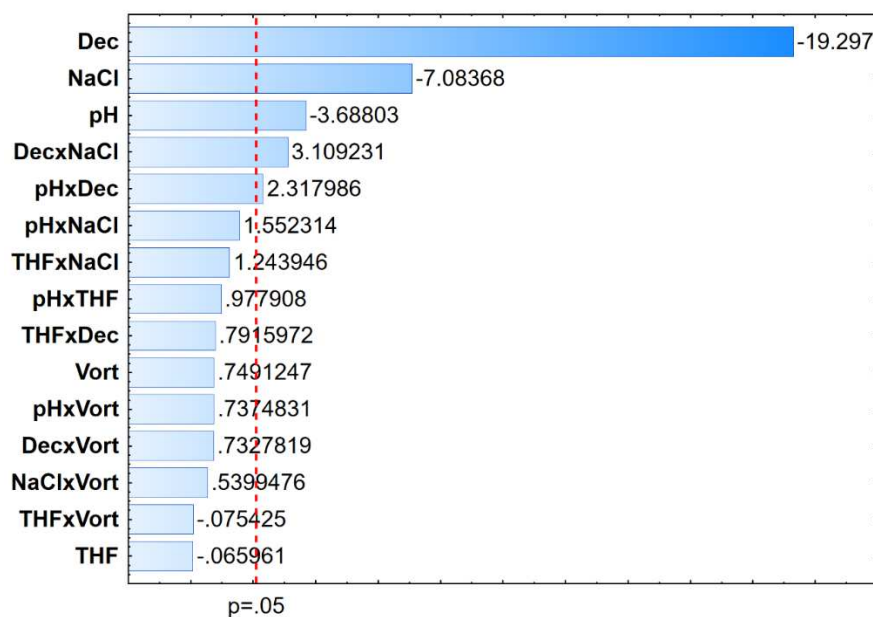
A Tabela 3 apresenta o planejamento fatorial fracionário  $2^{5-1}$  contendo os níveis avaliados e a resposta analítica expressa em termos de área cromatográfica.

**Tabela 3:** Matriz e resultados do planejamento fatorial fracionário  $2^{5-1}$ .

| Ensaio        | pH | THF<br>( $\mu$ L) | Decanol<br>( $\mu$ L) | NaCl<br>(%) | Vortex<br>(Min.) | Área | Área | Média |
|---------------|----|-------------------|-----------------------|-------------|------------------|------|------|-------|
| 1             | 4  | 750               | 500                   | 0,0         | 3,5              | 401  | 393  | 397   |
| 2             | 8  | 750               | 500                   | 0,0         | 0,5              | 337  | 332  | 335   |
| 3             | 4  | 1250              | 500                   | 0,0         | 0,5              | 383  | 384  | 384   |
| 4             | 8  | 1250              | 500                   | 0,0         | 3,5              | 346  | 309  | 328   |
| 5             | 4  | 750               | 1000                  | 0,0         | 0,5              | 203  | 201  | 202   |
| 6             | 8  | 750               | 1000                  | 0,0         | 3,5              | 186  | 174  | 180   |
| 7             | 4  | 1250              | 1000                  | 0,0         | 3,5              | 188  | 196  | 192   |
| 8             | 8  | 1250              | 1000                  | 0,0         | 0,5              | 169  | 171  | 170   |
| 9             | 4  | 750               | 500                   | 6,0         | 0,5              | 308  | 294  | 301   |
| 10            | 8  | 750               | 500                   | 6,0         | 3,5              | 265  | 263  | 264   |
| 11            | 4  | 1250              | 500                   | 6,0         | 3,5              | 286  | 304  | 295   |
| 12            | 8  | 1250              | 500                   | 6,0         | 0,5              | 267  | 262  | 265   |
| 13            | 4  | 750               | 1000                  | 6,0         | 3,5              | 164  | 147  | 156   |
| 14            | 8  | 750               | 1000                  | 6,0         | 0,5              | 146  | 121  | 134   |
| 15            | 4  | 1250              | 1000                  | 6,0         | 0,5              | 153  | 155  | 154   |
| 16            | 8  | 1250              | 1000                  | 6,0         | 3,5              | 127  | 130  | 129   |
| Ponto central | 6  | 1000              | 750                   | 3,0         | 2,0              | 211  | 212  | 207   |

**Fonte:** Autoria própria.

Com objetivo de avaliar o efeito das variáveis e suas interações do processo de pré-concentração com solvente supramolecular, construiu-se um diagrama de Pareto (Figura 8).

**Figura 8:** Gráfico do diagrama de Pareto.

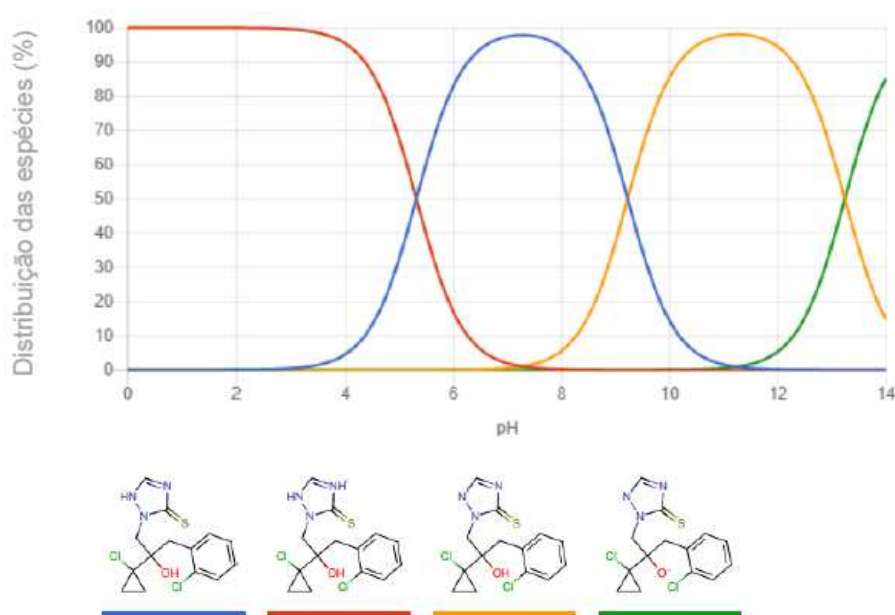
**Fonte:** Autoria própria.

O diagrama de Pareto é uma ferramenta estatística que permite avaliar todas as variáveis e suas interações para apresentação dos resultados de um determinado experimento. No diagrama, o comprimento da barra é proporcional ao valor absoluto do efeito principal estimado. A linha de referência vertical (tracejada vermelha) correspondente ao nível de significância de 95%. Essa ferramenta ajudar identificar quais efeitos são estatisticamente significativos na otimização do método de microextração.

Todos os efeitos que ultrapassam essa linha de referência são considerados significativos (72). Conforme o diagrama de Pareto, pode-se constatar que as variáveis 1-decanol, pH e NaCl, apresentaram significância dentro do domínio experimental com efeitos estimados negativos de (-19,297; -3,68803 e -7,08368), respectivamente, indicando que níveis menores dessas variáveis resultam no acréscimo na resposta analítica do método. Portanto, a eficiência de pré-concentração do método é maior nas seguintes condições experimentais: pH 4,00, uso de 500  $\mu$ L de 1-decanol e sem adição de NaCl.

O protoconazol possui uma constante de dissociação ( $pK_a$  6,9), devido a essa propriedade físico-química, em pH 4,00 o protoconazol apresentou maior solubilidade em 1-decanol. Para uma extração eficiente de compostos ionizáveis ou relativamente polares, o pH da solução desempenha um papel importante no processo de extração. O pH da solução deve ser menor que o  $pK_a$  do analito, para que a molécula permaneça na forma não ionizada, uma vez que, moléculas ionizadas possuem menor solubilidade em solventes orgânicos (73).

**Figura 9:** Distribuição das espécies de protoconazol em relação ao pH.



Fonte: Chemicalize (Chemaxon, 2023).

Conforme apresentado no diagrama de Pareto, observou-se um efeito negativo de (-19,297), indicando que menores volumes de 1-decanol no processo de microextração de protoconazol ocasiona um aumento na resposta analítica do método, sugerindo que maiores quantidades de 1-decanol pode ocasionar a diluição do protoconazol, conseqüentemente, diminuindo a área do pico cromatográfico. Portanto, a otimização do volume de 1-decanol utilizada na microextração é muito importante para garantir uma alta sensibilidade e eficiência do método analítico. Devido a esse motivo, o método de microextração foi otimizado utilizando o volume de 500  $\mu$ L de 1-decanol.

A utilização de NaCl no experimento apresentou significância negativa de (-7,08368) sugerindo que ausência de sal, ocasiona uma melhora na eficiência do método. Quando o sal é adicionado, ocorre um aumento na força iônica da solução reduzindo a solubilidade do analito na fase aquosa melhorando a eficiência de extração devido ao efeito salting-out. Este fenômeno ocorre devido à interação dos íons do sal com as moléculas de água, reduzindo sua capacidade de interação com as moléculas orgânicas (74). No entanto, se a concentração de sal for muito alta, pode ocorrer uma diminuição na eficiência de extração devido ao aumento das interações entre o analito e o sal em solução (75). Portanto, como o efeito de NaCl foi negativo, o método de microextração foi otimizado sem adição de sal.

Em relação ao tetraidrofurano, observa-se, de acordo com o diagrama de Pareto, ausência de significância dentro do domínio experimental (750 a 1250  $\mu\text{L}$ ). O efeito do solvente dispersor THF foi investigado nesse planejamento experimental, pois o solvente supramolecular é formado por agregados hexagonais invertidos de alcanóis que se formam espontaneamente na mistura com tetraidrofurano. O tamanho das gotículas coacervadas e as cavidades aquosas da estrutura hexagonal são dependentes de THF, fornecendo a esses solventes propriedades de acesso restrito (76). Portanto, como o efeito de THF não teve significância conforme o diagrama de Pareto, o volume de 750  $\mu\text{L}$  foi escolhido para o método de microextração.

O tempo de extração é uma variável importante que influencia na eficiência do processo de extração, isso ocorre porque a agitação por Vortex favorece a formação de microgotículas do solvente de extração, aumentando a superfície de contato permitindo uma extração eficiente e mais rápida, o qual é uma das grandes vantagens do método supramolecular (77,78). O tempo de agitação foi avaliado em 0,5; 2,0 e 3,5 minutos e o resultado não apresentou significância dentro do domínio experimental conforme demonstrado no diagrama de Pareto. Portanto, o tempo de vortex selecionado foi de 0,5 minutos para obtenção de um método de microextração mais rápido.

### 5.3 PARÂMETROS ANALÍTICOS

A Figura 10 ilustra o perfil cromatográfico obtido para o protioconazol antes e após a pré-concentração em condições otimizadas. Conforme demonstrado no cromatograma abaixo, podemos observar a alta sensibilidade do método utilizando microextração com solvente Supramolecular para determinação protioconazol.

**Figura 10:** Cromatograma representativo da análise da água da bacia de contenção obtido tanto para a amostra não fortificada quanto para a amostra fortificada com a concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de protioconazol, as amostras foram submetidas as seguintes condições, volume de amostra 40,0 mL de água em pH 4,00, 500,0  $\mu\text{L}$  de 1-decanol, 750,0  $\mu\text{L}$  de THF, 30 segundos de tempo de vortex e 3 minutos de centrifugação com rotação de 4000 rpm.



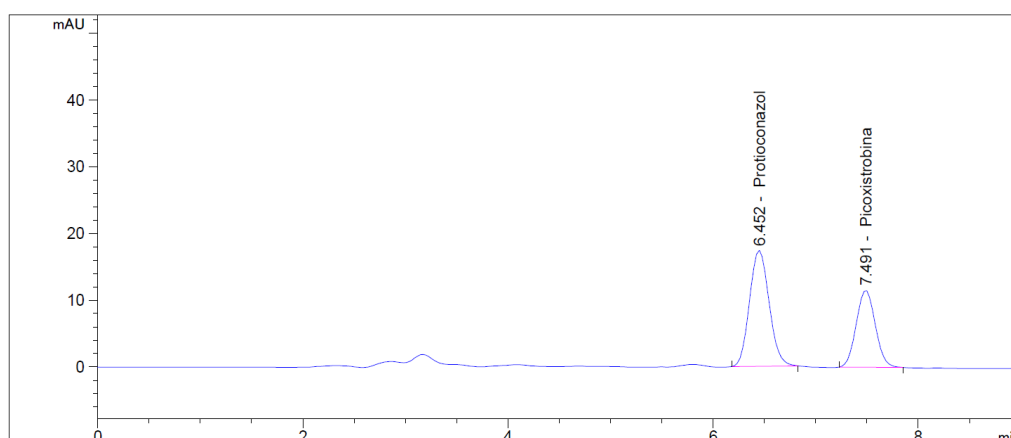
**Fonte:** Extraída do Software operacional OpenLab<sup>®</sup>.

A eficiência do método de microextração supramolecular foi avaliada a partir dos parâmetros de validação de métodos analíticos: seletividade, faixa linear de trabalho, equação da reta, coeficiente de regressão das curvas analíticas, pré-concentração, limite de detecção, limite de quantificação e precisão intradia e interdia e exatidão.

Seletividade é a capacidade que o método analítico possui em determinar exatamente um composto na presença de outros componentes, podendo ser impurezas ou componentes da matriz (79). A seletividade do método analítico foi avaliada pela pré-concentração de protioconazol com a matriz fortificada e pela pré-concentração da matriz fortificada contendo os fungicidas protioconazol, picoxistrobina e tebuconazol, ambos os testes foram realizados com a concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . Desta forma, foi checado se a resposta analítica dos fungicidas picoxistrobina e tebuconazol interferiam na recuperação analítica de protioconazol. Além deste teste, também foi avaliado o tempo de retenção dos picos cromatográficos. Conforme a Figura 11, observou-se que existe uma boa resolução entre os picos de protioconazol e Picoxistrobina, porém, o Tebuconazol não foi detectado na concentração  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  no comprimento de onda de 256 nm.

A escolha desses dois fungicidas foi baseada por serem ingredientes ativos fabricados na unidade fabril da empresa. De acordo com os resultados destas análises, verificou-se que o método proposto é seletivo para determinação do fungicida protioconazol em água.

**Figura 11:** Cromatograma representativo do ensaio de seletividade de uma amostra água de alto grau de pureza contendo os fungicidas protioconazol, picoxistrobina e tebuconazol com concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , a amostra foi submetida as seguintes condições, volume de amostra 40,0 mL de água em pH 4,00, 500,0  $\mu\text{L}$  de 1-decanol, 750,0  $\mu\text{L}$  de THF, 30 segundos de tempo de vortex e 3 minutos de centrifugação com rotação de 4000 rpm.

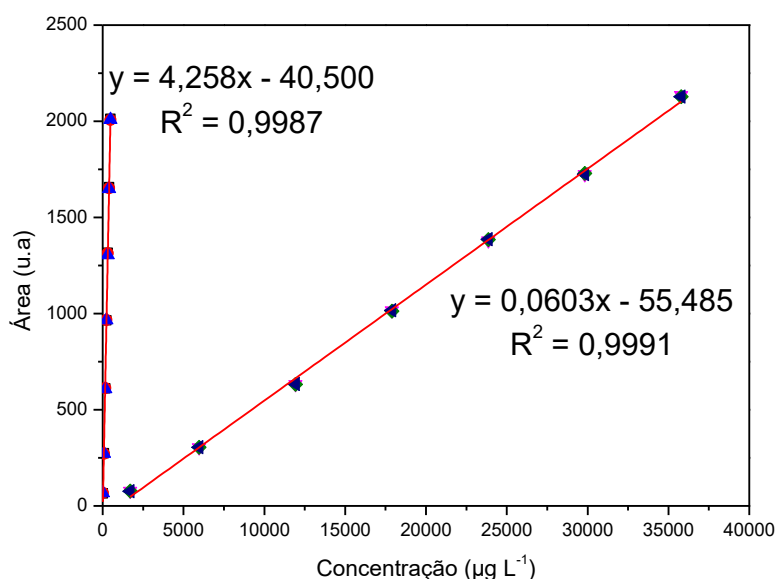


**Fonte:** Extraída do Software operacional OpenLab<sup>®</sup>.

Linearidade refere-se à capacidade de um método analítico em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de uma faixa especificada (80). A faixa linear de trabalho do método de microextração com solvente supramolecular foi avaliada e está demonstrada na Tabela 4. As duas curvas analíticas foram preparadas com 7 níveis de concentração e análise em triplicada, uma das curvas passando pelo processo de pré-concentração e outra apenas pela diluição do padrão analítico de protioconazol. Ambas as curvas analíticas apresentaram coeficiente de regressão  $R^2 > 0,99$ .

O fator de pré-concentração do método analítico utilizando microextração com solvente supramolecular foi calculado pela razão do coeficiente angular obtido pela curva analítica com e sem etapa de pré-concentração (54). O resultado encontrado de sensibilidade do método foi de 71 vezes.

**Figura 12:** Gráfico da faixa linear de trabalho de protioconazol em 7 níveis de concentração com etapa de pré-concentração ( $14,3 - 477,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e sem etapa de pré-concentração ( $1234 - 31597 \mu\text{g L}^{-1}$ ).



**Fonte:** Extraída do Software OriginLab®.

**Tabela 4:** Fator de pré-concentração, faixa linear de trabalho, limite de detecção e quantificação do método.

| Parâmetros  | Protioconazol |
|---|---------------|
| Faixa linear de trabalho ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | 14,3 – 477,2  |
| LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )                       | 4,2           |
| LQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )                       | 14,1          |
| FPC   | 71            |

LD: limite de detecção.

LQ: limite de quantificação.

FPC: fator de pré-concentração.

**Fonte:** Autoria própria.

A Precisão inter e intradia foi calculada no intervalo de 7 dias e estão demonstrados na Tabela 5 e 6. De acordo com os resultados das análises, o desvio padrão relativo (DPR) calculado foi aceito, pois encontra-se menor que o valor máximo permitido para essa faixa de concentração (valor máximo 15 %) conforme AOAC (81).

**Tabela 5:** Precisão intradia do método de análise de protioconazol.

| Parâmetros  | Protioconazol |       |
|---|---------------|-------|
| Concentração determinada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | 43,1          | 311,5 |
| Precisão (DPR, %)                                 | 2,4           | 1,7   |

Intradia (n = 10) - número de determinações.

DPR (%): precisão expressa como porcentagem de DPR.

**Fonte:** Autoria própria.

**Tabela 6:** Precisão interdia do método de análise de protioconazol.

| Parâmetros                                      | Protioconazol |       |
|---|---------------|-------|
| Concentração analisada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | 49,3          | 325,8 |
| Precisão (DPR, %)                               | 1,8           | 1,7   |

Interdia (n = 10) - número de determinações.

DPR (%): precisão expressa como porcentagem de DPR.

**Fonte:** Autoria própria.

#### 5.4 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS DE ÁGUA

As amostras de água coletadas na bacia de contenção da empresa da unidade de Taquari/RS e do Rio Ribeirão Lindóia da cidade de Londrina/PR foram analisadas conforme o método microextração com solvente supramolecular, a fim de verificar a viabilidade do método analítico para determinação do teor de protioconazol. Após a avaliação do método pela análise das amostras de água, a exatidão do método proposto foi avaliada pelo teste de adição e recuperação de protioconazol nas concentrações 80; 240; 400  $\mu\text{g L}^{-1}$  e os resultados das análises encontram-se dentro da faixa de concentração de 80 – 110 % conforme o critério de aceitação (81), comprovando a exatidão da metodologia analítica.

Os resultados do ensaio de exatidão do método estão apresentados na Tabela 7 e os cromatogramas representativos da análise da água da bacia de contenção e do rio Ribeirão Lindóia estão demonstrados nas Figuras 13 e 14.

**Tabela 7:** Resultados da exatidão de protioconazol nas amostras de água do Rio Ribeirão Lindóia e Bacia de Contenção.

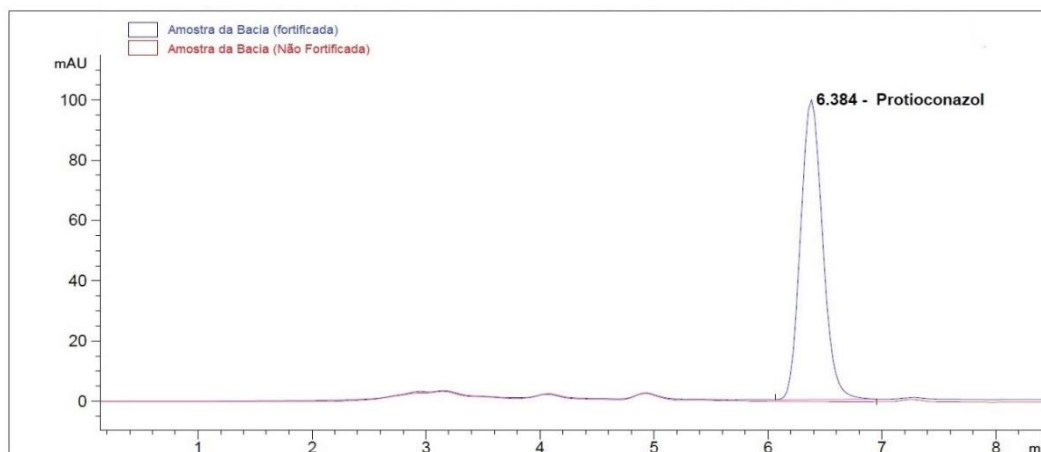
| Amostra              | Concentração Adicionada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | Concentração encontrada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | Recuperação % |
|----------------------|--|--|---------------|
| Rio Ribeirão Lindóia | 0,0  | < LD   | -             |
|                      | 80,0   | 78,6 $\pm$ 0,2                                   | 98,2          |
|                      | 0,0  | < LD   | -             |
|                      | 240,0  | 232,6 $\pm$ 0,4                                  | 96,9          |
|                      | 0,0  | < LD   | -             |
|                      | 400,0  | 393,3 $\pm$ 0,5                                  | 98,3          |
| Bacia de contenção   | 0,0  | < LD   | -             |
|                      | 80,0   | 78,2 $\pm$ 0,2                                   | 97,8          |
|                      | 0,0  | < LD   | -             |
|                      | 240,0  | 235,8 $\pm$ 0,4                                  | 98,3          |
|                      | 0,0  | < LD   | -             |
|                      | 400,0  | 395,6 $\pm$ 0,6                                  | 98,9          |

LD: Limite de detecção = 4,2  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Número de determinações (n=3).

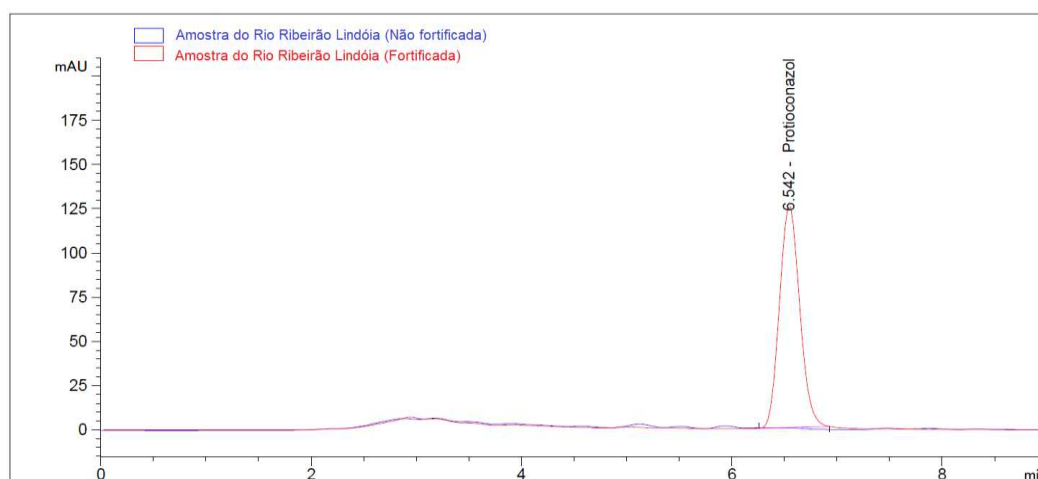
**Fonte:** Autoria própria.

**Figura 13:** Cromatograma representativo da análise da água da bacia de contenção obtido tanto para a amostra não fortificada quanto para a amostra fortificada com a concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de protioconazol, as amostras foram submetidas as seguintes condições, volume de amostra 40,0 mL de água em pH 4,00, 500,0  $\mu\text{L}$  de 1-decanol, 750,0  $\mu\text{L}$  de THF, 30 segundos de tempo de vortex e 3 minutos de centrifugação com rotação de 4000 rpm.



Fonte: Extraída do Software operacional OpenLab<sup>®</sup>.

**Figura 14:** Cromatograma representativo da análise da água do rio Ribeirão Lindóia obtido tanto para a amostra não fortificada quanto para a amostra fortificada com a concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de protioconazol, as amostras foram submetidas as seguintes condições, volume de amostra 40,0 mL de água em pH 4,00, 500,0  $\mu\text{L}$  de 1-decanol, 750,0  $\mu\text{L}$  de THF, 30 segundos de tempo de vortex e 3 minutos de centrifugação com rotação de 4000 rpm.



Fonte: Extraída do Software operacional OpenLab<sup>®</sup>.

A comparação do método proposto com outros métodos analíticos previamente relatados na literatura para a determinação de protioconazol por HPLC-UV-DAD está apresentada na Tabela 8. Com base na pesquisa bibliográfica realizada, foram encontrados poucos métodos de microextração de protioconazol na literatura. Portanto, a realização de novas pesquisas é de grande importância, considerando que o protioconazol é um dos principais fungicidas para o controle de ferrugem asiática no Brasil e novos produtos à base de protioconazol estão sendo desenvolvidos.

Após otimização do método utilizando solvente supramolecular e validação da metodologia analítica, verificou-se que o método proposto é simples e rápido em comparação com os outros métodos utilizando as técnicas de microextração líquido-líquido dispersiva e microextração líquido-líquido com emulsificação.

Os métodos desenvolvidos empregando a técnica de DLLME e ELLME apresentaram resultados semelhantes de limite de detecção e quantificação quando comparado com o método proposto. No entanto, o método de DLLME apresenta algumas desvantagens, tais como: o preparo da amostra requer etapas de aquecimento do ácido decanóico (solvente extrator) à 50° C, aquecimento da amostra à 90 °C e diluição da amostra para análise, o que torna o método um pouco mais trabalhoso e perigoso especialmente ao manusear amostras aquecidas. Enquanto, no ELLME o preparo da amostra é simples e a etapa mais longa do processo de microextração é de 5 minutos para separação de fase, pois o método não requer o uso de centrifuga. A desvantagem deste método em comparação com o método proposto neste trabalho, é que o fator de pré-concentração é de aproximadamente 23 vezes, enquanto o método proposto é de 71 vezes.

Desta forma, o método proposto é simples, rápido, com baixo limite de detecção e quantificação e quando comparado com os métodos por DLLME e ELLME, foi o que apresentou maior fator de pré-concentração do analito. Portanto, o método pode ser empregado para a determinação de protioconazol em amostras de água.

**Tabela 8:** Comparação dos métodos da literatura e do presente método para a determinação protioconazol com detecção por HPLC-UV-DAD.

| Analito  | Método de pré-concentração | Volume amostral (mL) | Solvente Extrator ( $\mu\text{L}$ ) | Tempo de extração | FPC | Faixa linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | LQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | Tipo de matrizes                     | Referência  |
|--|----------------------------|----------------------|-------------------------------------|-------------------|-----|---------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|-------------|
| Protioconazol  | DLLME                      | 5                    | 175                                 | 20 segundos       | -   | 27,1 - 1000                           | 27,1–37,3                   | 8.1–11.2                    | Água<br>Cerveja<br>Baijiu<br>Vinagre | (23)        |
| R-Protioconazol<br>S-Protioconazol<br>R-Protioconazol-<br>Desthio<br>S-Protioconazol-<br>Desthio | ELLME                      | 5                    | 200                                 | 5 minutos         | 23  | 10,0 - 1000                           | 10                          | 3                           | Água<br>Suco<br>Chá<br>Vinagre       | (24)        |
| Protioconazol  | SUPRA                      | 40                   | 500                                 | 30 segundos       | 71  | 14,3 – 477,2                          | 14,1                        | 4,2                         | Água                                 | Este estudo |

**Fonte:** Aatoria própria.

## 6. CONCLUSÃO

O método de microextração utilizando solvente supramolecular foi otimizado utilizando um planejamento fatorial fracionário  $2^{5-1}$  e os resultados mostraram uma alternativa eficiente para determinação de protioconazol em amostras de água.

O método de microextração foi desenvolvido baseado no conceito de Química Verde destacando-se por ser um método simples, rápido, além de consumir baixo volume de solvente extrator e de amostra, sendo uma técnica analítica sustentável e ambientalmente correta.

A metodologia analítica foi desenvolvida por cromatografia em fase reversa utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência. Para avaliação da eficiência do método, os seguintes parâmetros foram avaliados, tais como: resolução, fator de capacidade, simetria e número de pratos teóricos. Todos os parâmetros avaliados estão de acordo os critérios descritos na literatura.

O método por microextração utilizando solvente supramolecular foi validado por HPLC/UV/DAD e apresentou baixos níveis de detecção e quantificação com excelente nível de pré-concentração e de recuperação. Portanto, a metodologia desenvolvida pode ser aplicada para determinação protioconazol em amostras de água.

## REFERÊNCIAS

1. SPADOTTO, C. A. et al. Monitoramento do risco ambiental do agrotóxicos: princípios e recomendações. **Embrapa Meio Ambiente**, v. 42, p. 29, 2004.
2. KHURSHID, C. et al. Pesticide residues in European sediments: A significant concern for the aquatic systems? **Environmental Research**, v. 261, August, p. 9, 2024.
3. SOUZA, R. M. et al. Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: A review. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 135, p. 16, January, 2020.
4. YI, J.; GERBENS-LEENES, P. W.; ALDAYA, M. M. Crop grey water footprints in China: The impact of pesticides on water pollution. **Science of the Total Environment**, v. 935, p.11, May, 2024.
5. LEGESSE, A. et al. A fast, simple and efficient surface floating organic droplet-based air-assisted liquid-liquid microextraction for simultaneous extraction of multiclass pesticides from environmental water, mineral water and soft drink samples by HPLC-DAD. **Microchemical Journal**, v. 201, p. 10, April, 2024.
6. EISSA, F. et al. Pesticide residues in fruits and vegetables: Analysis and risk assessment of EU RASFF notifications between 1999 and 2022. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 134, p. 9, July, 2024.
7. KARDANI, F. et al. Determination of 323 pesticide residues in Iran's cereal by GC-MS and HPLC-UV combined with QuEChERS extraction and mixed-mode SPE clean-up method. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 124, p. 19, September, 2023.
8. MUSARURWA, H.; TAVENGWA, N. T. Switchable solvent-based micro-extraction of pesticides in food and environmental samples. **Talanta**, v. 224, August, p.9, August, 2021.

9. WANG, Q. FENG et al. Application of a reversed-phase ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction method for the extraction and preconcentration of domoic acid from urine samples. **Heliyon**, v. 8, p. 8, July, 2022.
10. SILVA, F. A. et al. A miniaturized liquid-liquid extraction method for further Na, K, Ca, and Mg determination in crude oil by FAAS. **Talanta**, v. 257, p. 8, January, 2023.
11. HASHEMI, B. et al. Recent advances in liquid-phase microextraction techniques for the analysis of environmental pollutants. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 97, p. 13, August, 2017.
12. VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. SPME, Solid Phase Micro-Extraction. Fundamental aspects of Solid Phase Micro-Extraction (SPME) are discussed in the present paper. The application of SPME as a microtechnique of sample preparation for gas chromatographic analysis is considered and relate. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 8, Outubro, 1999.
13. ZHOU, J. et al. Recent advances in accelerating solid-phase extraction. **Journal of Chromatography Open**, v. 6, p. 12, July, 2024.
14. SOLTANI, S.; SERESHTI, H. A green alternative QuEChERS developed based on green deep eutectic solvents coupled with gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of pesticides in tea samples. **Food Chemistry**, v. 380, p. 9. January, 2022.
15. QIN, Y. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction based on a supramolecular solvent followed by high-performance liquid chromatographic analysis of lignans in Forsythiae Fructus. **Journal of Separation Science**, v. 46, n. 5, p.9, March, 2023.
16. TURSEN, J. et al. Determination of imidacloprid and acetamiprid in bottled juice by a new DLLME-HPLC. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 36, p. 11, May, 2021.

17. SALAMAT, Q. et al. Novel generation of nano-structured supramolecular solvents based on an ionic liquid as a green solvent for microextraction of some synthetic food dyes. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 23, p. 8, October, 2018.
18. DALMAZ, A.; SIVRIKAYA ÖZAK, S. Environmentally-friendly supramolecular solvent microextraction method for rapid identification of Sudan I–IV from food and beverages. **Food Chemistry**, v. 414, p. 7, February, 2023.
19. COSTI, E. M.; SICILIA, M. D.; RUBIO, S. Supramolecular solvents in solid sample microextractions: Application to the determination of residues of oxolinic acid and flumequine in fish and shellfish. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 9, p. 8, January, 2010.
20. FARAJI, M. et al. Supramolecular-based solvent microextraction of carbaryl in water samples followed by high performance liquid chromatography determination. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 97, n. 8, p. 14, July, 2017.
21. LIMA, Giovana de Fátima. **DETERMINAÇÃO DE SULFETO EM ÁGUA COM PREPARO DE AMOSTRA “IN-LINE” POR ANÁLISE EM FLUXO MULTISSEGMENTADO**. 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2010.
22. NOVAES, C. G. et al. Optimization of analytical methods using response surface methodology part i: Process variables. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 32, Abril, 2017.
23. JING, X. et al. Popping candy-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for enantioselective determination of prothioconazole and its chiral metabolite in water, beer, Baijiu, and vinegar samples by HPLC. **Food Chemistry**, v. 348, p. 7, January, 2021.

24. GUO, X. et al. Determination of chiral prothioconazole and its chiral metabolite in water, juice, tea, and vinegar using emulsive liquid–liquid microextraction combined with ultra-high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 440, p. 8, December, 2024.
25. KOLEY, S. et al. Identification and assessment of Critical parameters affecting drinking water quality: A case study of water treatment plants of India. **Groundwater for Sustainable Development**, v. 26, p. 14, June, 2024.
26. YANG, R. et al. Optimizing the management of multiple water resources in irrigation area under uncertainty: A novel scenario-based multi-objective fuzzy-credibility constrained programming model. **Journal of Hydrology**, v. 640, p. 17, July, 2024.
27. DOS SANTOS, A. M.; GALVINCIO, J. D.; DE MOURA, M. S. B. Cambio climático y el flujo en la cuenca del rio Goiana - Pernambuco - Brasil. **Investigaciones Geograficas**, v. 81, n. 81, p. 15, Mayo, 2012.
28. HAMED, L. M. M. et al. Examining the relationship between the economic growth, energy use, CO2 emissions, and water resources: Evidence from selected MENA countries. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 23, n. 6, p. 9, April, 2024.
29. LLANTADA, I. DA R. et al. Environmental impacts in water resources surrounding world surfing reserves: A case study in the Madre Watershed, Brazil. **Environmental Development**, v. 51, p.21, August, 2024.
30. ANYANGO, G. W.; BHOWMICK, G. D.; SAHOO BHATTACHARYA, N. A critical review of irrigation water quality index and water quality management practices in micro-irrigation for efficient policy making. **Desalination and Water Treatment**, v. 318, p. 17, April, 2024.
31. AHMED, A. A. et al. Applications of machine learning to water resources management: A review of present status and future opportunities. **Journal of Cleaner Production**, v. 441, p. 18, January, 2024.

32. BENAIFI, M. et al. Suitability of treated wastewater for irrigation and its impact on groundwater resources in arid coastal regions: Insights for water resources sustainability. **Heliyon**, v. 10, n. 8, p. 18, April, 2024.
33. FREITAS, Diego Antonio França. **Boas Práticas Agrícolas para a Produção de Alimentos Seguros**. 1a edição ed. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2022.
34. BRASIL, CropLife. **Os agrotóxicos são importantes e podemos te provar**. Disponível em: <<https://croplifebrasil.org/noticias/os-agrotoxicos-sao-importantes-e-podemos-te-provar/>>. Acesso em: 4 jun. 2024.
35. BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E A. **Lei no 7.802, sobre agrotóxicos**. p. 8–9, 2009.
36. DÍAZ, A. et al. **Boas práticas agrícolas para uma agricultura mais resiliente: diretrizes para orientação de produtores e governos**. Embrapa, p. 73, 2017.
37. CENTURIÓN, M. P. B. et al. Regulation of pesticide residues in food in the MERCOSUR: a much needed discussion for health surveillance. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, v. 47, p. 9, Novembro, 2022.
38. PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, CASA CIVIL, S. PARA A. J. **Decreto no 4.074** de 04 de janeiro de 2002. Disponível em: <<https://faolex.fao.org/docs/pdf/bra48739.pdf>>. Acesso em: 6 jun. 2024.
39. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Registro de agrotóxicos**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/perguntasfrequentes/agrotoxicos/registro-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 3 jun. 2024.
40. LV, Z. et al. Construction and formulation optimization of prothioconazole nanoemulsions for the control of *Fusarium graminearum*: Enhancing activity and reducing toxicity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 227, p.10, May, 2023.

41. OKAFOR, C. E.; ONYIDO, I. Controlled release formulations of organophosphorus pesticides based on ecofriendly novel and conventional matrices for agro-environmental sustainability. **Sustainable Chemistry for the Environment**, v. 7, p.12, August, 2024.
42. ZHANG, M. et al. Prothioconazole exposure disrupts oocyte maturation and fertilization by inducing mitochondrial dysfunction and apoptosis in mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 213, p. 11, January, 2024.
43. WANG, L. et al. Enantioselective toxicity assessment of prothioconazole on earthworms (*Eisenia foetida*) in artificial soil environments. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 283, p. 7, May, 2024.
44. HUANG, J. et al. Isolation of *Sphingomonas* sp. AJ-1 and its enantioselective S-methylation of the triazole fungicide prothioconazole. **Science of the Total Environment**, v. 851, p. 8, August, 2022.
45. WEI, J. et al. Resistance risk assessment of *Fusarium pseudograminearum* from wheat to prothioconazole. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 191, p. 10, January, 2023.
46. ZHAI, W. et al. Enantioselective degradation of prothioconazole in soil and the impacts on the enzymes and microbial community. **Science of the Total Environment**, v. 824, p. 10, February 2022.
47. JIANG, Y. et al. High-fast enantioselective determination of prothioconazole in different matrices by supercritical fluid chromatography and vibrational circular dichroism spectroscopic study. **Talanta**, v. 187, p. 7, May, 2018.
48. ZHANG, Z. et al. Toxification metabolism and treatment strategy of the chiral triazole fungicide prothioconazole in water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 432, p. 10, March, 2022.

49. NIU, J. et al. Quaternized chitosan-based organic-inorganic nanohybrid nanoparticles loaded with prothioconazole for efficient management of fungal diseases with minimal environmental impact. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 262, p.11, January, 2024.
50. SHI, Y. et al. Removal of prothioconazole using screened microorganisms and identification of biodegradation products via UPLC-QqTOF-MS. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 206, p. 9, August, 2020.
51. CARASEK, E. et al. Sustainable green solvents for microextraction techniques: Recent developments and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1640, p. 10, January 2021.
52. RUTKOWSKA, M. et al. Liquid–phase microextraction: A review of reviews. **Microchemical Journal**, v. 149, p.8, June, 2019.
53. BALLESTEROS-GÓMEZ, A.; SICILIA, M. D.; RUBIO, S. Supramolecular solvents in the extraction of organic compounds. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 677, n. 2, p. 23, July, 2010.
54. SCHEEL, Guilherme Luiz.; TARLEY, César Ricardo Teixeira. Simultaneous microextraction of carbendazim, fipronil and picoxystrobin in naturally and artificial occurring water bodies by water-induced supramolecular solvent and determination by HPLC-DAD. **Journal of Molecular Liquids**, v. 297, p. 9, October, 2019.
55. LANJWANI, M. F. et al. Optimization of vortex-assisted supramolecular solvent-based liquid liquid microextraction for the determination of mercury in real water and food samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 134, p.12, June, 2024.
56. ARGHAVANI-BEYDOKHTI, S. et al. Highly efficient preconcentration of anti-depressant drugs in biological matrices by conducting supramolecular solvent-based microextraction after dispersive micro solid phase extraction technique. **Microchemical Journal**, v. 190, p. 10, March 2023.

57. SHEVALEV, R. et al. Liquid-phase microextraction approach using supramolecular solvent formed in aqueous systems based on di(2-ethylhexyl)phosphoric acid salt: Spectrophotometric determination of antipyrine in saliva. **Journal of Molecular Liquids**, v. 404, p. 8, June, 2019.
58. OLIVEIRA, L. L. G. et al. Development and multivariate optimization of nanostructured supramolecular liquid-liquid microextraction validated method for highly sensitive determination of methyl parathion in water samples. **Journal of Molecular Liquids**, v. 308, p.10, April, 2020.
59. BALLESTEROS-GÓMEZ, A. et al. Hyphenating Supramolecular Solvents and Liquid Chromatography: Tips for Efficient Extraction and Reliable Determination of Organics. **Chromatographia**, v. 82, n. 1, p. 14, September 2018.
60. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução RDC no 166, de 24 de julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**, p. 1–21, 24 jul. 2017.
61. CETESP. **Guia Nacional De Coleta E Preservação De Amostras**. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2021/10/Guia-nacional-de-coleta-e-preservacao-de-amostras-2012.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2024.
62. SABIR, A. M.; MOLOY, M.; BHASIN, P. S. Hplc Method Development and Validation: a Review. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 4, n. 4, p. 13, 2017.
63. SANJAY, K. D.; KUMAR, H. D. R. Importance of RP-HPLC in analytical method development: A review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 12, p. 8, November, 2012.
64. MOLDOVEANU, S. C.; DAVID, V. HPLC Analysis. **Essentials in Modern HPLC Separations**, p. 465–519, 2013.

65. MEYER, V. R. **Practical high-performance liquid chromatography**: Fourth edition. Em: [s.l: s.n.]. v. 3p. 1–357.
66. BISWAS, K. M. et al. A simple and efficient approach to reversed-phase HPLC method screening. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 3, p. 10, January, 2009.
67. BRAGA, Silmara Leoncio. **GUIA PARA DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS**. 2010. 66 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.
68. MEYER, V. R. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**: Fifth Edition. *Practical High-Performance Liquid Chromatography: Fifth Edition*, p. 1–402, 2010.
69. ASHOUR, H. K. et al. A green sustainable approach for the determination of a complex quintet hepatoprotective mixture using dual wavelength HPLC coupled with diode array detection: Compliance with greenness and whiteness metrics. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 35, p. 15, July, 2023.
70. CRAWFORD SCIENTIFIC. **The Theory of HPLC: Chromatographic Parameters**. Disponível em: <[https://www.inacom.nl/wp-content/uploads/2020/04/theory\\_of\\_hplc\\_chromatographic\\_parameters\\_\\_1\\_.pdf](https://www.inacom.nl/wp-content/uploads/2020/04/theory_of_hplc_chromatographic_parameters__1_.pdf)>. Acesso em: 10 nov. 2024.
71. LINDA, L. Reviewer Guidance - Validation of chromatographic methods. **CDER. Center for Drug Evaluation and Research**, v. 22, n. 3, p. 1–30, 1998.
72. STALIKAS, C. et al. Developments on chemometric approaches to optimize and evaluate microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 15, November, 2008.

73. GRECCO, C. F. et al. Extração líquido-líquido assistida pelo efeito salting out para análise de amostras biológicas. **Scientia Chromatographica**, v. 10, n. 2, p. 10, Abril, 2018.
74. ZOHRABI, P. et al. Liquid-phase microextraction of organophosphorus pesticides using supramolecular solvent as a carrier for ferrofluid. **Talanta**, v. 160, p. 7, July, 2016.
75. DENG, H. et al. A novel approach based on supramolecular solvent microextraction and UPLC-Q-Orbitrap HRMS for simultaneous analysis of perfluorinated compounds and fluorine-containing pesticides in drinking and environmental water. **Microchemical Journal**, v. 151, p. 8, September 2019.
76. YILDIZ, E.; ÇABUK, H. Miniaturized matrix solid-phase dispersion coupled with supramolecular solvent-based microextraction for the determination of paraben preservatives in cream samples. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 13, p. 9, April, 2018.
77. ZHAO, W. et al. Vortex-assisted Emulsification Microextraction for the Determination of Pyrethroids in Mushroom. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 40, n. 10, p. 8, September, 2019.
78. ZHAO, W. et al. Supramolecular solvent-based vortex-mixed microextraction: Determination of chiral triazole fungicide in beer samples. **Chirality**, v. 30, n. 3, p. 8, November, 2017.
79. UWONO, M.; INDRAYANTO, G. Validation of Chromatographic Methods of Analysis. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**, v. 32, n. 05, p. 17, 2005.
80. MARSON, B. M. et al. Validation of Analytical Methods in a Pharmaceutical Quality System: An Overview Focused on HPLC Methods. **Quimica Nova**, v. 43, n. 8, p. 14, Setembro, 2020.
81. SOLYOM, A. M. et al. Aoac Smpr(®) 2016.003. **Journal of AOAC International**, v. 99, n. 4, p. 1102–1104, 2016.