



ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS - EQA
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

AGROTÓXICOS EM URINA HUMANA: ESTUDO DE MÉTODO E
APLICAÇÃO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Caroline Borges Rocha

Rio Grande, 2022

AGROTÓXICOS EM URINA HUMANA: ESTUDO DE MÉTODO E APLICAÇÃO

Por

Caroline Borges Rocha

Trabalho apresentado ao curso de Química Bacharelado da Universidade Federal do Rio Grande (FURG, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Bacharel em Química**.

Orientador(a): Ednei Gilberto Primel

Coorientador(a): Sergiane Caldas Barbosa

Rio Grande, RS, Brasil

2022

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE E AUTENTICIDADE

Eu, **Caroline Borges Rocha**, declaro que este trabalho é de minha autoria, tendo sido elaborado com base nos recursos aos quais faço referência ao longo do texto e experiências no decorrer do referido trabalho.

Assinatura do Orientando

Rio Grande, 23 de agosto de 2022.

*“Quando você se apaixona pelo processo e não pelo resultado,
não precisa esperar para se dar ao luxo de ser feliz.”*

-James Clear

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao professor Dr. **Ednei Gilberto Primel** por todas as oportunidades que me foram dadas durante a graduação. Pelos puxões de orelha e incentivos ao longo de toda minha iniciação científica. Obrigada por tudo.

Aos professores da banca do TCC1 e TCC 2, **Rosilene Clementin, Ana Baisch, Jean Arias, Juliano Carvalho Ramos e Frederico Rodriguês** pela disposição em participar e por todas as sugestões dadas ao trabalho.

A Dra. **Sergiane Caldas Barbosa**, ‘mãe Sergi’, por essa amizade que virou família, por ter me acolhido, sempre me incentivando e não me deixado desistir. Muito obrigado, você e Rafinha são o maior presente que o LACOM me deu e que eu vou levar até o fim.

Ao Dr. **Jean Lucas Arias**, por toda parceria e amizade nesses 4 anos, por todos os ensinamentos e por tornar as atividades mais divertidas, você é um exemplo de profissional para mim.

Aos meus pais, **Vera e Edilson**, a quem eu dedico esse trabalho. Se hoje eu alcancei meus sonhos, foi porque vocês sempre estiveram ao meu lado. Obrigada por todos os valores e pelo amor incondicional.

As minhas irmãs, **Aléxia e Letícia**, minhas maiores saudades. Obrigada por todo o apoio e por serem meu porto seguro.

Ao meu namorado, **Augusto**, por ser meu maior incentivador, meu parceiro de vida e por tornar a vida mais leve.

A minha segunda família de RG, **Sergi, Marcio, Rafa, Aiessa, Enzo, Edson, Vania e Sergio**, vocês me adotaram e tornaram Rio Grande um lar para mim. Vou guardar sempre no meu coração.

A Dra. **Larine Kupski**, por sua alegria contagiante, parceria e amizade. Com você os dias na Furg eram mais divertidos.

As grandes amigas **Tainah Barcat e Thaina Pedro**, as “Tainas”, que se tornaram uma das amizades mais importantes, saudades de estarmos todas juntas no Cassino. Vocês são muito importantes na minha vida.

A todos os colegas do **LACOM** que tive o prazer de conhecer, pela parceria, momentos de descontração e pela troca de ensinamentos diários, vocês fizeram parte da minha formação profissional e pessoal.

A todos os meus professores da graduação, vocês me acompanharam ao longo desses 5 anos e cada um tem uma mãozinha no meu crescimento.

A **FURG**, por ser minha segunda casa, pela oportunidade do ensino totalmente público, gratuito e de qualidade.

RESUMO

AGROTÓXICOS EM URINA HUMANA: ESTUDO DE MÉTODO E APLICAÇÃO

Autor: Caroline Borges Rocha
Orientador: Ednei Gilberto Primel
Rio Grande, 23 de agosto de 2022

Os agrotóxicos são compostos sintéticos empregados para garantia da produção de alimentos. Entretanto, resíduos destes têm sido detectados em diversos compartimentos ambientais e amostras de alimentos. Uma vez presente nos alimentos consumidos pelos seres humanos, eles são distribuídos, em sua maioria, através da corrente sanguínea e são excretados principalmente pela urina. A urina é uma matriz amplamente empregada em estudos de biomonitoramento devido ser de fácil coleta e não invasiva, pela disponibilidade de grandes volumes de amostra, além de ser o principal meio de eliminação de substâncias do corpo humano. Entretanto, para verificação da ocorrência de agrotóxicos em amostras complexas como a urina, antes da determinação, é necessária uma etapa prévia de preparo de amostra devido aos coextrativos presentes e aos baixos níveis ($\mu\text{g L}^{-1}$ ou ng L^{-1}) que estes compostos se encontram. Entre as técnicas de preparo de amostra, a Microextração Líquido-líquido Induzida pelo Efeito *Salting-out* (SILLME, do inglês *Salting-out Induced Liquid-liquid Microextraction*), se destaca por ser uma técnica rápida, robusta e com baixa exposição ao analista, além de contribuir com alguns princípios da Química Analítica Verde como redução do volume de amostra, redução de reagentes e geração de menor volume de resíduos. Pelo exposto, esse projeto teve como objetivo a padronização de um método analítico utilizando a SILLME e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas em série (GC-MS/MS, do inglês *Gas Chromatography tandem Mass Spectrometry*) para determinação de agrotóxicos em amostras de urina. Com o desenvolvimento deste tipo de estudo espera-se contribuir com o avanço nas técnicas de preparo de amostra em Química Analítica, com a disponibilização de um método rápido, barato, que permite a extração e determinação de agrotóxicos em amostras de urina contribuindo assim com estudos de biomonitoramento, os quais são indispensáveis para o entendimento da exposição humana a estes compostos.

Palavras chaves: “agrotóxicos”; “urina”; “validação”; “GC-MS/MS”; SILLME”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas do método SILLME. Adaptado de DU, 2014	22
Figura 2: Influência da massa de amostra na recuperação dos triazóis em amostras de urina humana. Experimentos foram realizados utilizando 4mL de água ultrapura, 1mL de acetonitrila e 2g de MgSO ₄ . As barras de erros indicam RSD (%).	33
Figura 3: Esquema do método SILLME padronizado para determinação de triazóis em urina humana	34
Figura 4: Cromatogramas do branco e padrão no extrato para cada agrotóxico. (1 – Epoxiconazol, 2 – Hexaconazol e 3 – Penconazol).....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Reclassificação toxicológica dos agrotóxicos, ANVISA	16
Tabela 2: Estrutura molecular e informações sobre os triazóis estudados	18
Tabela 3: Revisão de trabalhos para determinação de agrotóxicos em amostras de urina a partir de 2018, com destaque para as técnicas de preparo de amostra.	21
Tabela 4: Revisão de trabalhos que utilizaram técnicas de extração induzidas pelo efeito <i>salting-out</i>	23
Tabela 5: Avaliação de extração dos triazóis em amostras de urina humana empregando SILLME. Experimentos foram realizados utilizando 1g de amostra, 4 mL de água ultrapura, 1 mL de acetonitrila e 2 g de MgSO ₄	32
Tabela 6: Limite de detecção instrumental (LDi), limite de quantificação instrumental (LQi), limite de detecção do método (LDm), limite de quantificação do método (LQm), faixa linear, coeficiente angular (a), intercepto (b), coeficiente de determinação (R ²) para curva analítica preparada no extrato.	35
Tabela 7: Exatidão e precisão em termos de repetibilidade.	37
Tabela 8: Exatidão e precisão em termos de precisão intermediária.....	37
Tabela 9: Comparação do método proposto nesse trabalho com outros métodos empregados para determinação de agrotóxicos em urina humana.....	40

LISTA DE SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

GC – Cromatografia Gasosa, do inglês, *Gas Chromatography*

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*

IDA – Ingestão Diária Aceitável

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

K_{ow} – Coeficiente de partição octanol-água, do inglês *octanol/water partition coefficient*

LC – Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

LD – Limite de detecção, do inglês *Limit of Detection*

LLE – Extração Líquido-líquido, do inglês, *Liquid-liquid Extraction*

LMR – Limite Máximo de Resíduo

LQ – Limite de quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

QuEChERS – Método rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro, do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*

r – Coeficiente de correlação linear

R% - Recuperação

RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês, *Relative Standard Deviation*

s/n – Relação sinal-ruído

SALLE – Extração Líquido-líquido Assistida por Sal, do inglês, *Salting-out Assisted Liquid-Liquid Extraction*

SALLME - Microextração Líquido-líquido Assistida pelo efeito *Salting-out*, do inglês *Salting-out Assisted Liquid-liquid Microextraction*

SILLME – Microextração Líquido-líquido induzida pelo efeito *salting-out*, do inglês, *Salting-out Induced Liquid-liquid Microextraction*

SPE – Extração em Fase Sólida, do inglês, *Solid Phase Extraction*

SRM – Monitoramento de Reações Seletivas, do inglês, *Selective Reaction Monitoring*

VMP – Valor Máximo Permitido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	DESENVOLVIMENTO	15
3.1	Revisão Bibliográfica	15
3.1.1	Agrotóxicos – Aspectos Gerais	15
3.1.2	Agrotóxicos – Classificação e toxicidade.....	16
3.1.3	Agrotóxicos - classes químicas.....	17
3.1.3.1	Triazóis	17
3.1.4	Agrotóxicos – Exposição dos seres humanos.....	18
3.1.5	Urina	19
3.1.6	Preparo de amostras.....	20
3.1.6.1	Técnicas de Preparo de Amostra para determinação de agrotóxicos em urina..	20
3.1.6.2	Técnica SILLME de preparo de amostra	21
3.1.7	Técnicas Cromatográficas para análise de agrotóxicos em urina.....	23
3.1.7.1	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas em série.	24
3.1.8	Validação	24
3.2	Material e Métodos	26
3.2.1	Instrumentação.....	26
3.2.2	Reagentes, solventes e materiais	27
3.2.3	Preparo das soluções analíticas	27
3.2.4	Analitos selecionados para estudo	28
3.2.5	Amostras	28
3.2.6	Condições Instrumentais	28
3.2.7	Técnica SILLME de preparo de amostra.....	29
3.2.7.1	Otimização da massa de amostra.....	29
3.2.8	Validação	29
3.2.8.1	Curvas Analíticas e Linearidade	30
3.2.8.2	Limite de Detecção e Limite de Quantificação	30
3.2.8.3	Exatidão.....	30
3.2.8.4	Precisão.....	31
3.2.9	Resíduos	31

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	Avaliação da técnica SILLME de preparo de amostra	32
4.1.1	Avaliação da massa de amostra	32
4.2	Método padronizado	33
4.3	Validação do método.....	35
4.3.1	Curva analítica e linearidade	35
4.3.2	Limites de detecção e quantificação	36
4.3.3	Exatidão e Precisão.....	36
4.3.4	Seletividade	38
4.4	Aplicabilidade.....	39
4.5	Comparação com outros métodos da literatura.....	39
5	CONCLUSÃO.....	41
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1 INTRODUÇÃO

Com o passar dos anos a agricultura se tornou cada vez mais dependente do uso de agrotóxicos. Isso porque a demanda foi se tornando maior devido a necessidade do aumento da produção de alimentos ocasionada pelo aumento da população (GRIGORI, 2019).

Os agrotóxicos são compostos químicos ou biológicos que tem por objetivo controlar pragas e tornar a produção agrícola mais robusta e efetiva (LOPES et al., 2018).

Embora seu uso seja de grande importância para o aumento e qualidade da produção agrícola, estes compostos podem afetar negativamente o meio ambiente e os seres humanos. No meio ambiente, o uso intensivo de agrotóxicos pode causar a degradação de compartimentos ambientais, como solo e água, e a contaminação de organismos aquáticos e terrestres. Na saúde humana, a constante exposição a esses compostos, pelas vias oral, dérmica ou inalação, podem causar desde intoxicações agudas até efeitos tardios como alguns tipos de câncer (LOPES et al., 2018; BURNS et al., 2021). Dentre os principais meios de exposição dos seres humanos aos agrotóxicos, destacam-se as dietas alimentares. Depois que o agrotóxico é ingerido durante a alimentação, parte dele pode ser absorvida e excretada através da urina, suor e ar exalado (MEDEIROS et al., 2021).

Diversos estudos têm o objetivo de monitorar agrotóxicos em diferentes matrizes, como na água e alimentos. Porém, com o intuito de entender a contaminação humana por agrotóxicos, dados de biomonitoramento são usados (MEDEIROS et al., 2021).

A definição de biomonitoramento é dada como uma medição direta da exposição humana aos contaminantes por meio da substância química presente em matrizes biológicas. A escolha da matriz biológica para análise é determinada pelas propriedades químicas e farmacocinéticas da substância que se deseja analisar. As amostras mais convencionais são o sangue e a urina (BORDIN et al., 2015; MEDEIROS et al., 2021).

A urina é uma matriz biológica que consiste em um ultrafiltrado do sangue formado pelos rins. Em sua composição constam substâncias químicas orgânicas (como ureia, ácido úrico e creatinina) e inorgânicas (como íons cloreto e sódio) dissolvidas em água (HARDY et al., 2021). Como a urina é a principal via de eliminação de substâncias, esta matriz é geralmente alvo de investigação de contaminantes.

Por ter diversas substâncias em sua composição, a urina é considerada uma matriz complexa e necessita de uma etapa de preparo de amostra, que tem o intuito de isolar o analito da matriz, minimizando e/ou eliminando interferentes. Os avanços nas áreas de preparo de amostra foram cruciais para a determinação de agrotóxicos em amostras complexas; e estas

técnicas vêm sendo modificadas com o objetivo de garantir exatidão utilizando menores volumes de amostra, solventes e otimizando o tempo de análise (BORDIN et al., 2015; MEDEIROS et al., 2021).

Entre essas técnicas, destaca-se a Microextração Líquido-líquido Induzida pelo Efeito *Salting-out* – SILLME (do inglês *Salting-out Induced Liquid-Liquid Microextraction*), inicialmente proposta para determinação de fluoroquinolonas em amostras de água, alimentos e matrizes biológicas (DU et al., 2014). Esta técnica emprega extração com acetonitrila e partição com $MgSO_4$, caracterizando-se como uma técnica miniaturizada por utilizar quantidades de amostras e solventes reduzidas quando comparada com outras técnicas clássicas (DU et al., 2014).

Entre as técnicas para determinação de agrotóxicos, a Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em série (GC-MS/MS, do inglês *Gas Chromatography tandem Mass Spectrometry*) tem sido bastante utilizada, pois fornece informações qualitativas e quantitativas sobre os compostos, sendo sensível a pequenas concentrações dos analitos e seletiva, podendo-se analisar compostos com o mesmo tempo de retenção (COLLINS et al., 2006; SAMSIDAR et al., 2018).

Diante do exposto, o estudo de técnicas de preparo de amostras para determinação de agrotóxicos em urina é importante uma vez que da aplicação desses métodos são obtidos dados que auxiliam no entendimento sobre a exposição humana a estes compostos assim como, em discussões de como ajustar a necessidade de uso de agrotóxicos para garantia da produção e ao mesmo tempo minimizar a exposição humana a estes resíduos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo o estudo de um método para determinação de agrotóxicos em amostras de urina empregando a técnica de preparo de amostra SILLME e detecção por GC-MS/MS.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os parâmetros de extração do preparo de amostra empregando a técnica SILLME para extração de agrotóxicos em urina;
- Validar o método de detecção por GC-MS/MS, através das seguintes figuras de mérito: limites de detecção, limites de quantificação, curva analítica, linearidade, seletividade, exatidão, precisão e efeito matriz;
- Realizar a aplicação do método validado para determinação de agrotóxicos em amostras de urina.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 Revisão Bibliográfica

3.1.1 Agrotóxicos – Aspectos Gerais

Agrotóxicos são compostos sintéticos ou naturais destinados a matar, controlar ou combater algum tipo de praga. Estes compostos foram introduzidos logo após a segunda Guerra Mundial; e vários destes eram usados como arma química nas guerras da Coréia e do Vietnã, como o Agente Laranja, uma mistura de 2,4-D e 2,4,5 T, que dizimou milhares de soldados e civis (MEIRA, 2015).

Na década de 50, aconteceu a chamada Revolução Verde, onde as tecnologias usadas na Guerra foram trazidas para a agricultura com intuito de otimizar o processo agrícola, e suprir a demanda de alimentos. No Brasil, essa revolução iniciou nos anos 1960 e 1970, tendo se intensificado com o Programa Nacional de Defensivos Agrícolas. Criado no contexto do Plano Nacional de Desenvolvimento, o programa instituiu o uso de agrotóxicos como um componente indispensável do pacote tecnológico imposto aos agricultores (IPEA, 1975; CARSON, 2010).

No ano de 2002, o lançamento do decreto Nº 4.074, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que regulamenta a lei Nº 7.802 de 1989, define agrotóxicos e afins como produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de 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, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento (ANVISA, 2002).

Atualmente, mais de 500 ingredientes ativos são permitidos para utilização no Brasil, de acordo com os critérios estabelecidos em suas monografias, distribuídos em diversas formulações de agrotóxicos que estão registrados na ANVISA (ANVISA, 2021).

3.1.2 Agrotóxicos – Classificação e toxicidade

Os agrotóxicos podem ser classificados quanto a praga que são destinados a combater (fungicidas, herbicidas, inseticidas, acaricidas), quanto a sua composição química (orgânico sintético, inorgânico e botânico) e quanto a sua toxicidade (AGROLINK, 2021).

A exposição a agrotóxicos pode causar quadros de intoxicação leve, moderada ou grave, a depender da quantidade do produto absorvido, do tempo de absorção, da toxicidade do produto e do tempo decorrido entre a exposição e o atendimento médico. As consequências descritas na literatura compreendem: alergias; distúrbios gastrointestinais, respiratórios, endócrinos, reprodutivos e neurológicos; neoplasias; mortes acidentais; suicídios; entre outros (GARCIA et al., 2016).

No ano de 2019, a ANVISA alterou a classificação dos agrotóxicos quanto a sua toxicidade através da resolução-RE Nº 2.080, de 31 de julho de 2019. Com a reclassificação duas novas categorias foram adicionadas; a “categoria 5 - improvável de causar dano agudo” e a categoria “não classificados”, que possuem níveis de toxicidades menores, como pode-se observar na Tabela 1. Na reclassificação, um total de 1.942 produtos passaram por uma avaliação pela Agência, destes, 43 produtos foram recolocados na categoria de produtos extremamente tóxicos, 79 na de altamente tóxicos, 136 na categoria de moderadamente tóxicos, 599 nos de pouco tóxicos, 899 foram classificados como produtos improváveis de causar dano agudo, e 168 produtos entraram na categoria de não classificados (ANVISA, 2019).

Tabela 1: Reclassificação toxicológica dos agrotóxicos, ANVISA

	Categoria 1	Categoria 2	Categoria 3	Categoria 4	Categoria 5	Não Classificado
	Extremamente tóxico	Altamente Tóxico	Moderadamente Tóxico	Pouco Tóxico	Improvável de Causar Dano Agudo	Não Classificado
Via de Exposição						
Oral	Fatal se ingerido	Fatal se ingerido	Tóxico se ingerido	Nocivo se ingerido	Pode ser perigoso se ingerido	-
Dérmica	Fatal em contato com a pele	Fatal em contato com a pele	Tóxico em contato com a pele	Nocivo em contato com a pele	Pode ser perigoso em contato com a pele	-
Inalatória	Fatal se inalado	Fatal se inalado	Tóxico se inalado	Nocivo se inalado	Pode ser perigoso se inalado	-

Fonte: Anvisa, 2019.

3.1.3 Agrotóxicos - classes químicas

No Brasil, existe uma grande diversidade de princípios ativos de agrotóxicos, por isso, é importante conhecer a classificação dos agrotóxicos quanto à sua ação e ao grupo químico a que pertencem. Essa classificação também é útil para o diagnóstico das intoxicações. As principais classificações quanto as classes químicas dos agrotóxicos são os organofosforados, carbamatos, organoclorados, piretróides e triazóis (LI et al., 2020).

Dentre as classes dos agrotóxicos mais consumidos, estão os fungicidas triazóis.

3.1.3.1 Triazóis

Os triazóis são compostos heteroaromáticos sintéticos caracterizados pela presença de um anel de 5 membros contendo 3 nitrogênios e 2 carbonos. São compostos que possuem um vasto campo de aplicação, como na agricultura e em fármacos, possuem baixo peso molecular e alta estabilidade térmica (ALBRECH, 2019).

Na agricultura, os triazóis pertencem a classe dos fungicidas sistêmicos, que são utilizados no controle de fungos em plantas, atuando na formação do ergosterol, que é um importante lipídio fúngico para a formação da membrana celular. A ausência desta camada leva ao colapso do micélio (célula fúngica) e à interrupção do crescimento micelial (corpo fúngico) (BALARDINE et al., 2019).

Os triazóis são muito utilizados por possuírem elevada fungitoxicidade a organismos causadores de doenças como ferrugens, oídios e manchas foliares (ALBRECH, 2019),

Estudos têm sido realizados para avaliar o efeito destes fungicidas em animais, e testes mostram a tendência a causarem tumores, desregulação endócrina e distúrbios nos sistemas reprodutivos de ratos. A persistência destes no solo também ocorre, o que pode levar a intoxicação de plantações se não forem respeitados os tempos de aplicações (BORDAGARAY et al., 2016).

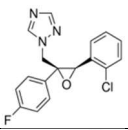
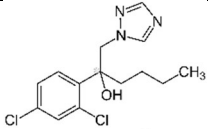
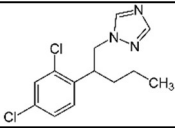
Triazóis tem sido encontrados em diferentes matrizes como amostras de água (citar algum trabalho), sedimento (citar algum trabalho), alimentos (citar algum trabalho) e também em amostras biológicas, como é o caso da urina. Recentemente, estes 7 triazóis foram avaliados em amostras de urina de voluntários da cidade de Alfenas – MG, onde pelo menos 1 fungicida foi encontrado nas amostras de 21 voluntários, dos quais 14 amostras estavam acima do limite

de quantificação do método com valores entre 10,38 e 138,24 $\mu\text{g L}^{-1}$, e 5 amostras de urina continham mais de 1 fungicida (MACHADO et al., 2019).

Na Tabela 2, encontram-se os analitos selecionados para o estudo e algumas informações (PUBCHEM, 2021).

Por conta das preocupações frente a esses contaminantes e possíveis danos aos seres humanos e meio ambiente, torna-se importante o desenvolvimento de técnicas de preparo de amostra que permitam a determinação e quantificação destes, de forma confiável, segura e que consiga a determinação de níveis baixos de concentração.

Tabela 2: Estrutura molecular e informações sobre os triazóis estudados

Analito	Estrutura	Massa Molar (g mol^{-1})	log KoW	Solubilidade em água 20 °C (mg L^{-1})	Classificação toxicológica (ANVISA)	Ingestão Diária Aceitável
Epoxiconazol		329,76	3,44	7,1	Categoria 4 - Pouco Tóxico	0,003 mg $\text{kg}_{\text{p.c.}}^{-1}$
Hexaconazol		314,2	3,7	16,9	Não classificado	Não classificado
Penconazol		284,18	4,4	73	Não classificado	Não classificado

3.1.4 Agrotóxicos – Exposição dos seres humanos

Os seres humanos estão constantemente expostos aos agrotóxicos, e estes podem oferecer riscos à saúde, dependendo do produto que foi utilizado, do tempo de exposição e da quantidade de produto absorvida pelo organismo. E esta exposição pode ocorrer de forma intencional, acidental, ocupacional, ou através da dieta alimentar (LOPES et al., 2018).

O uso intencional de agrotóxicos se configura quando o mesmo é utilizado como tentativa de suicídio. Estima-se que esses compostos estejam por trás de 10 a 20% dos suicídios no mundo. Somente no Brasil, entre 2000 e 2017, ocorreram 48.738 intoxicações e 2.266 óbitos após a tentativa de suicídio usando agrotóxicos (GUNNELL et al., 2003; SINTOX, 2021).

A exposição acidental aos agrotóxicos pode ocorrer de diversas maneiras, seja por via oral ou em contato direto com os compostos na pele. Os trabalhadores agrícolas podem

consumir agrotóxicos se não lavarem as mãos antes de comer ou encostar em partes sensíveis do corpo como olhos. No Brasil ocorreram 55.657 casos relatados de intoxicação acidental por agrotóxicos entre 2000 e 2017 (MEDEIROS et al., 2021; SINTOX, 2021).

A exposição ocupacional aos agrotóxicos está relacionada com o ambiente de trabalho, nisso estão inclusas pessoas envolvidas em indústrias de produção e formulação de agrotóxicos e agricultores. Diversos meios de exposição existem no meio agrícola, seja durante a preparação da calda ou até na limpeza de equipamentos. No Brasil, ocorreram 25.038 casos de intoxicação de trabalhadores por agrotóxicos, entre 2000 e 2017. Os casos de intoxicação intencional, acidental e ocupacional poderiam ser minimizados se esses compostos fossem armazenados de modo seguro e se o acesso e manuseio desses produtos fossem mais restritos (GARCIA et al., 2016; SINTOX, 2021).

A dieta alimentar é uma das principais vias de exposição aos seres humanos, por isso, existem diretrizes para o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Visando proteger a saúde humana, órgãos regulamentadores estabelecem parâmetros como limites máximos de resíduos (LMR) e ingestão diária aceitável (IDA). O LMR é a quantidade máxima (expressa em mg kg^{-1}) de resíduo de agrotóxico que é permitida em alimentos. A IDA é um parâmetro de segurança definido como a quantidade estimada do agrotóxico nos alimentos que pode ser ingerida diariamente sem riscos à saúde (ANVISA, 2020).

Após a ingestão, através da dieta alimentar, os agrotóxicos podem ser absorvidos ao longo do trato gastrointestinal e atingir a corrente sanguínea, podendo se distribuir por todo o organismo e estes, podem ser excretados pela urina, pele e ar exalado (RATANACHINA et al., 2020).

3.1.5 Urina

A urina é um líquido excretado pelos rins através das vias urinárias, e ela é composta por aproximadamente 95% de água e 2% de ureia. Nos 3% restantes, podemos encontrar fosfato, sulfato, amônia, magnésio, cálcio, ácido úrico, creatina, sódio, potássio e outros elementos. É através da urina que são eliminadas substâncias desnecessárias ao organismo humano, por isso, é uma das matrizes trabalhadas em estudos de biomonitoramento (BORDIN et al., 2015).

Além de ser o principal meio de eliminação de substâncias, a urina é uma matriz de fácil coleta e não invasiva, pode-se obter grandes volumes de amostra para análise, com quantidade

média diária de urina formada no organismo de uma pessoa saudável de 1200 mL, e ainda apresenta alta estabilidade quando congelada, permitindo que seja armazenada por bastante tempo (TSAI et al., 2017).

3.1.6 Preparo de amostras

Na maioria das análises, principalmente em matrizes complexas, os analitos se encontram em baixos níveis de concentração, na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} . Devido a este fato, torna-se necessário uma etapa prévia de preparo de amostra. A etapa de preparo de amostra é considerada uma das mais críticas e importantes do processo analítico. Essa etapa consome cerca de 80% do tempo total de análise e deve ser conduzida com cuidado, pois pode introduzir erros ao processo (JARDIM, 2010). A etapa de preparo tem por finalidade promover a extração, se necessário fazer a pré-concentração da amostra e remover interferentes (PRESTES et al., 2009).

3.1.6.1 Técnicas de Preparo de Amostra para determinação de agrotóxicos em urina

Existem diversas técnicas descritas na literatura para extração de agrotóxicos em urina. As mais citadas na literatura são a Extração Líquido-líquido (LLE – do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) e a Extração em Fase Sólida (SPE – do inglês *Solid Phase Extraction*) nas configurações *off-line* e *on-line*, e o método QuEChERS (Método rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro, do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*)

Entretanto, novas técnicas de preparo de amostra, focadas em seguir os preceitos da Química Analítica Verde, têm sido empregadas para esse tipo de análise, técnicas miniaturizadas, mais rápidas e que expõem menos o analista e o meio ambiente (GALUSZKA et al., 2013). Dentre essas técnicas, destaca-se a SILLME. A Tabela 3 apresenta algumas técnicas e os principais parâmetros analíticos empregados na determinação de agrotóxicos em amostras biológicas humanas.

Tabela 3: Revisão de trabalhos para determinação de agrotóxicos em amostras de urina a partir de 2018, com destaque para as técnicas de preparo de amostra.

Analitos	Preparo de Amostra	Limite de Detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Limite de Quantificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
19 metabólitos multiclasse	SPE	0,10 - 0,40	0,2 - 11	Denghel et al., 2018
6 agrotóxicos multiclasse	SPE	0,10 - 0,60	n.i. ^b	Gálvez et al., 2018
Glifosato e AMPA	SPE	1,0 - 3,0	2,5-6	Chen et al., 2019
Glifosato	SPE	n.i.	0,5	Connoly et al., 2019
6 agrotóxicos organofosforados	SPE	0,02 - 0,63	n.i.	Hioki et al., 2019
ácido- 6- cloronicotinóide, ácido - 3 fenóxibenzóico	LLE	0,075 - 0,049	0,226 - 0,146	Pantelis et al., 2019
4 agrotóxicos organofosforados	LLE ^c	0,004 - 0,80	n.i.	Personne et al., 2019
12 agrotóxicos e metabólitos multiclasse	QuEChERS ^d	0,60 - 4,40	1,7 - 20	Sweeney et al., 2019
6 agrotóxicos multiclasse	LLE	0,0002 - 0,006	0,0005 - 0,02	Zhang et al., 2019
6 agrotóxicos e metabólitos organofosforados	SPE	0,005 - 0,32	0,02 - 1,7	Binter et al., 2020
45 agrotóxicos e metabólitos multiclasse	SPE	n.i.	0,0005 - 0,00072	Pirard et al., 2020
6 agrotóxicos organofosforados	LLE	0,01 - 0,1	0,03 - 0,3	Tamar et al., 2020

^aSPE – *Solid Phase Extraction*; ^bn.i. – não informado; ^cLLE – *Liquid Liquid Extraction*; ^dQuEChERS- *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*

3.1.6.2 Técnica SILLME de preparo de amostra

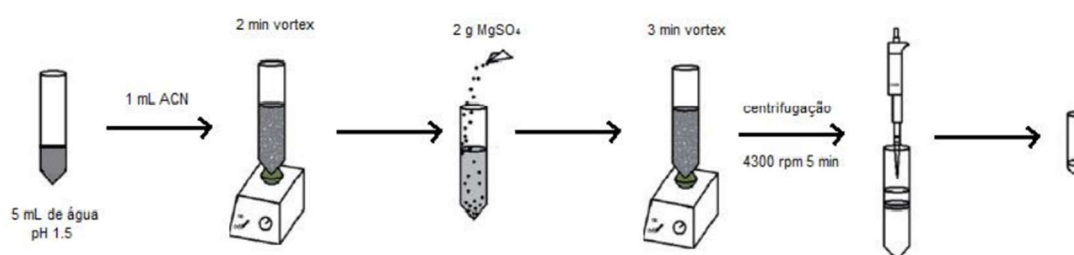
A técnica SILLME de preparo de amostra foi desenvolvida por Du e colaboradores no ano de 2014, com o intuito de determinar fluoroquinolonas em água, alimentos e matrizes biológicas (Du et al., 2014). A SILLME foi criada como uma modificação da técnica de Extração Líquido-líquido assistida pelo efeito *Salting-out* (SALLE, do inglês *Salting-out Assisted Liquid-liquid Extraction*) desenvolvida em 1973 para a extração de metais quelatos em amostras aquosas (MATKOVICH e CHRISTIAN, 1973).

Estas técnicas são baseadas no fenômeno de separação de fases induzida pelo efeito *salting-out*, onde a fase orgânica é separada a partir de uma solução aquosa homogênea e simultaneamente os analitos são extraídos quando sais orgânicos ou inorgânicos são adicionados (MORENO-GONZÁLEZ e GARCÍACAMPAÑA, 2017).

Na SILLME proposta em 2014, 1 mL de Acetonitrila (MeCN) é adicionado a 5 mL da solução contendo a amostra, seguidos de rápida agitação em vórtex; após, 2 g de MgSO₄ são adicionados e a amostra é agitada em vórtex por 3 minutos. O sobrenadante é transferido para

um tubo de vidro de 10 mL, onde é submetido à secagem em fluxo de nitrogênio em banho aquecido a 40 °C. O resíduo é redissolvido em 400 µL da fase móvel, agitado em vórtex e filtrado em membrana, estando pronto para análise cromatográfica (DU et al., 2014). Estas etapas estão representadas na Figura 1.

Figura 1: Etapas do método SILLME. Adaptado de DU, 2014



Na literatura é possível encontrar outros nomes para técnicas com o mesmo princípio de extração, como a SALLME (Microextração Líquido-líquido Assistida pelo efeito *Salting-out*, do inglês *Salting-out Assisted Liquid-liquid Microextraction*). Embora os autores proponham diferentes nomes para as técnicas, como as próprias variações da SALLE, a SALLME e a SILLME, todas estas apresentam o mesmo princípio: partição do solvente extrator altamente miscível com a fase aquosa pelo efeito *salting-out*. Estas técnicas mencionadas têm sido aplicadas na determinação de diferentes compostos orgânicos nas mais variadas matrizes, conforme pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4: Revisão de trabalhos que utilizaram técnicas de extração induzidas pelo efeito *salting-out*.

Matriz	Analito	Solvente Extrator	Volume solvente extrator	Sal	Massa de sal	Técnica de Detecção	Referência
Plasma sanguíneo	Daclatasvir	Acetonitrila	500 µL	NH ₄ CH ₃ CO ₂ ^b	0,2 g	UV - VIS ^f	Abdallah et al., 2021
Alimentos processados	Conservantes	Acetonitrila	1000 µL	MgSO ₄ ^c	2 g	HPLC-UV	Arias et al., 2021
Plasma sanguíneo	Alogliptina	Acetonitrila	500 µL	NaCl ^a	0,25 g	HPLC-UV ^e	Hammad et al., 2021
Urina	Tetraciclina	1-Octilamina	50 µL	NaCl	0,2 g	HPLC-UV	Cherkashina et al., 2018
Água, alimentos e matrizes biológicas	Fluoroquinolonas	Acetonitrila	1200 µL	MgSO ₄	2 g	HPLC-FLD ^g	Du et al., 2014
Humor vítreo	Dorzolomida e timolol	Acetonitrila	90 µL	(NH ₄) ₂ SO ₄ ^d	0,11 g	HPLC-UV	Maaboud et al., 2014

^aNaCl – Cloreto de Sódio; ^b NH₄CH₃CO₂ – Acetato de Amônio; ^c MgSO₄ – Sulfato de Magnésio; ^d(NH₄)₂SO₄- Sulfato de Amônio; ^eHPLC-UV - *High Performance Liquid Chromatography with ultraviolet detection*; ^fUV-VIS - *UV/Visible Spectroscopy*; ^gHPLC-FLD - *High Performance Liquid Chromatography with fluorescent detection*;

3.1.7 Técnicas Cromatográficas para análise de agrotóxicos em urina

A cromatografia é uma das técnicas mais utilizadas para análise de agrotóxicos, devido sua capacidade de separar os compostos de interesse mesmo em baixas concentrações. É um método físico-químico, no qual a separação é realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, uma estacionária, e uma fase móvel (COLLINS et al., 2006; PIAO et al., 2014).

Várias técnicas cromatográficas têm sido utilizadas para a determinação de agrotóxicos em matrizes biológicas. Dentre as técnicas cromatográficas, destaca-se a GC-MS/MS (PIAO et al., 2014; RAZA et al., 2018).

3.1.7.1 *Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas em série.*

A cromatografia a gás é uma técnica altamente seletiva, que permite a separação de compostos voláteis e termicamente estáveis. É uma técnica que possibilita realizar determinações rápidas e sensíveis, em matrizes de diferentes complexidades. A espectrometria de massas acoplada à técnica cromatográfica potencializa a qualidade dos resultados tendo em vista a possibilidade de informação estrutural e massa molar, com aumento de seletividade (SKOOG, 2002).

Na cromatografia gasosa, a amostra é introduzida na coluna através de um sistema de injeção. Deve-se otimizar a temperatura ideal para o injetor e para a coluna, possibilitando assim, a vaporização das substâncias, que de acordo com as propriedades de fase estacionária e de suas volatilidades, percorrem a coluna em tempos diferentes. No final da coluna, é feita a detecção e quantificação dos analitos utilizando um detector adequado e um sistema de aquisição de dados (COLLINS et al., 2006).

Na espectrometria de massas os átomos ou moléculas de uma amostra são ionizados na fonte, e a razão massas-carga (m/z) de cada íon é determinada pelo analisador de massas. Os íons atingem o detector gerando sinais elétricos que são registrados na forma de um espectro de massas (ISSA et al., 2020).

Uma das principais vantagens de se usar um GC-MS/MS é a existência de um banco de dados usados na hora de montar o método no equipamento. Os bancos de dados possuem informações sobre o índice de retenção de compostos, as transições de quantificação, confirmação e as energias de colisão para cada agrotóxico, facilitando na hora de montagem e otimização do método (DUTTA et al., 2020)

3.1.8 Validação

Quando pretende-se desenvolver um novo método analítico, é necessário garantir que os resultados obtidos são confiáveis e interpretáveis. Para isso, o método deve passar por um processo de validação. Órgãos regulamentadores do Brasil e de outros países tem documentos oficiais com as diretrizes a serem adotadas pelos laboratórios nos processos de validação de métodos. Sempre que se desenvolve um novo método, ele só será considerado confiável se for

validado de acordo com as normas estabelecidas nos guias de validação (ECONOMOU et al., 2009; INMETRO, 2020).

No Brasil, as agências que verificam a competência dos laboratórios são a ANVISA e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). As últimas resoluções das agências credenciadas para procedimentos de validação de métodos analíticos são o DOQ-CGCRE-008 de abril de 2020 do INMETRO e a Resolução RE nº 166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020).

Os principais parâmetros avaliados na validação de métodos são seletividade, linearidade, intervalo da curva de calibração, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão e precisão.

A seletividade mede o grau em que o método pode quantificar os analitos, na presença de interferentes. Um método que produz respostas para vários compostos, mas que consegue diferenciar a resposta de um analito da de outros, é um método seletivo (INMETRO, 2020).

A linearidade corresponde a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito de interesse, dentro de uma determinada faixa de aplicação. Essa relação normalmente é expressa como uma equação de reta chamada curva analítica, onde esta curva é montada a partir de uma regressão linear. A partir dos pontos experimentais, é possível calcular os coeficientes de regressão a e b , e o coeficiente de correlação r . O INMETRO recomenda que a linearidade seja avaliada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes, sendo o LQ o primeiro ponto da curva (INMETRO, 2020).

A precisão representa a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A precisão é expressa por meio de repetibilidade, precisão intermediária ou reprodutibilidade e pode ser demonstrada através do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*). Quando se trata de repetibilidade, a avaliação é feita na amostra sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica, utilizando 3 concentrações: baixa, média e alta em réplicas em cada nível. A precisão intermediária é a realização da análise no mesmo processo descrito anteriormente, porém em dias diferentes. Os critérios de aceitação para o INMETRO é de $RSD \leq 30\%$ (INMETRO, 2020).

A exatidão de um método analítico é obtida pelo grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. Uma das formas de expressar a exatidão é através da relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra, ou pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente. Em termos

de recuperação, um intervalo de 40 até 120% é aceitável quando trabalhando na faixa de concentrações de 1 ppb ($\mu\text{g kg}^{-1}$) (INMETRO, 2020).

O LD é demonstrado através da obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Um dos métodos de determinação é o da razão sinal-ruído (s/n), sendo a razão maior ou igual a 3:1 (INMETRO, 2020). Já o LQ é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas, também pode-se utilizar o método do sinal-ruído, sendo a razão deste 10:1 (INMETRO, 2020).

3.2 Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais - LACOM, lotado na Escola de Química e Alimentos - EQA da Universidade Federal do Rio Grande - FURG. As análises cromatográficas para a determinação de agrotóxicos em urina foram realizadas no Laboratório de Cromatografia do Centro Integrado de Análises da CIA - FURG.

3.2.1 Instrumentação

- Balança Analítica de precisão modelo FA 2104N, (Bioprecisa, Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (100 μL , 1000 μL e 5000 μL) (Labmate, Polônia);
- Bomba à vácuo Tecnal TE-058 (Piracicaba, Brasil);
- Sistema de Purificação de água Milli-Q Direct-Q UV3® Millipore (Millipore, USA);
- pHmetro Hanna pH20 pH21 – eletrodo de vidro combinado (Kasvi, Brasil);
- Ultrassom Quimis modelo Q335D (Quimis, Brasil);
- Agitador tipo vórtex modelo Certomat® MV-B. Braun (Bioteck Internacional, Brasil);
- Centrífuga de tubos microprocessada modelo Quimis® Q222T (Quimis, Brasil);
- Cromatógrafo a Gás GC-2010 Plus (Shimadzu, Japão)
- Espectrômetro de Massas modelo GCMS-TQ8050 Plus (Shimadzu, Japão)
- Auto amostrador modelo AOC-6000 Plus (Shimadzu, Japão)

3.2.2 Reagentes, solventes e materiais

- Acetonitrila, grau HPLC (J.T. Baker, Mallinckrodt, USA);
- Água ultrapura, purificada em sistema Direct-Q UV3® Millipore (resistividade 18,2 MΩ cm⁻¹);
- Detergente Extran® neutro (Merck, Brasil);
- Água destilada obtida por sistema de destilação da EQA;
- Acetona, PA (Vetec, Brasil);
- Padrões analíticos dos analitos (pureza > 99%);
- Vidraria comum de laboratório (balões volumétricos, béquer e espátulas);
- Tubos de polipropileno, com tampas rosqueáveis, 15 mL de capacidade (Sarstedt, Alemanha);
- MgSO₄ anidro (J.T. Baker, Mallinckrodt, USA);
- Frascos de vidro (vials), capacidade de 2,0 mL.

3.2.3 Preparo das soluções analíticas

As soluções estoque de concentração 1000 mg L⁻¹ dos triazóis em estudo foram preparadas através da dissolução dos padrões sólidos em acetonitrila grau HPLC, sendo armazenadas em frascos âmbar e estocadas a baixas temperaturas. Os padrões utilizados possuem alto teor de pureza, superior a 99%. A partir das soluções estoques de 1000 mg L⁻¹ foram preparadas as soluções estoque de concentração 100 mg L⁻¹, em acetonitrila, de cada analito. Uma solução trabalho de 10 mg L⁻¹ foi preparada a partir da mistura dos 3 triazóis. Esta solução foi utilizada para preparar as diluições para a otimização do método, obtenção da curva analítica e nos ensaios de recuperação.

3.2.4 Analitos selecionados para estudo

Devido à grande utilização de fungicidas na agricultura, torna-se provável que ocorra a contaminação dos alimentos e automaticamente dos seres humanos que consomem os mesmos. Dessa forma, optou-se pelo desenvolvimento de um método para determinação do epoxiconazol, penconazol e hexaconazol em amostras de urina, sendo esses analitos selecionados por conta do grande uso dos triazóis na agricultura, alta ocorrência em alimentos e ocorrência em amostras biológicas.

3.2.5 Amostras

Para a aplicação do método propostos foram utilizadas amostras oriundas do trabalho de doutorado da aluna Julia Penteado do Programa de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, orientado pela Prof. Dra. Ana Luiza Muccillo Baisch. Esse trabalho possui aprovação do conselho de ética parecer nº55/2019.

3.2.6 Condições Instrumentais

Para determinação dos agrotóxicos foi utilizado um cromatógrafo à gás modelo TQ 8050, equipado com amostrador automático modelo Combipal AOC 6.000 e detector espectrômetro de massa com um analisador do tipo triplo quadrupolo, todos da Shimadzu. As condições instrumentais foram obtidas a partir da Smart Pesticides Database versão 2 (Shimadzu, Japão) e estão descritas a seguir: o gás de arraste usado foi o hélio (99,999% pureza) a uma taxa de fluxo constante de $2,21 \text{ mL min}^{-1}$. A temperatura do injetor foi $250 \text{ }^\circ\text{C}$ e $2 \text{ } \mu\text{L}$ do extrato foram injetados a uma pressão de 150 kPa no modo *splitless*. Para a separação dos agrotóxicos foi utilizada uma coluna capilar Rtx®-5MS ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \text{ } \mu\text{m}$) (Restek, Bellefonte, PA, EUA), empregando uma rampa de temperatura iniciando em $90 \text{ }^\circ\text{C}$ e permanecendo nesta temperatura por 1 min , seguido por um taxa de aquecimento de $30 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ até $130 \text{ }^\circ\text{C}$. Por fim, o forno foi aquecido até $320 \text{ }^\circ\text{C}$ em uma taxa de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, permanecendo nesta temperatura por 3 min , com tempo total de análise de $24,33 \text{ min}$. A ionização dos agrotóxicos foi realizada por impacto de elétrons (EI) com energia de 70 eV . As temperaturas da interface e da fonte de íons foram $290 \text{ }^\circ\text{C}$ e $230 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. As determinações foram realizadas no modo de monitoramento seletivo de reações (SRM, do

inglês *Selective Reaction Monitoring*), empregando argônio como gás de colisão (pureza de 99,9999%). A manipulação do equipamento, coleta e tratamento de dados foram realizados pelo software GCMSsolution, versão 4.45 SP1.

3.2.7 Técnica SILLME de preparo de amostra.

A SILLME foi otimizada a fim de obter recuperações próximas de 100% com RSD menor ou igual a 20% para todos os compostos avaliados.

Para o desenvolvimento do método empregando SILLME, foram realizadas modificações no método de Arias *et al.* (2021), de forma a adequar os experimentos à necessidade deste trabalho. Assim, as condições iniciais empregadas no estudo foram: 1,0 g de amostra e 4,0 mL de água ultrapura são adicionados a um tubo de polipropileno de 15 mL, seguidos da adição de 1,0 mL de acetonitrila e 1 minuto de agitação em vórtex. Em seguida, são adicionados 2,0 g de MgSO₄, seguidos de 3 minutos de agitação em vórtex. Os extratos são centrifugados por 5 minutos a 5000 rpm e uma alíquota de 1 mL do sobrenadante é transferida para um vial para determinação por GC-MS/MS.

3.2.7.1 Otimização da massa de amostra.

Para avaliar a influência da massa de amostra no método SILLME, foi realizado procedimento conforme descrito no item 3.2.7. Foram selecionados 1,0, 2,5 e 5 g de amostra. Para a otimização inicial, foi empregada uma amostra de urina aleatória como matriz, fortificada para ter a concentração final de 100 µg kg⁻¹ em triplicata, além de uma amostra em branco, para preparo dos padrões no extrato.

3.2.8 Validação

O método proposto foi validado seguindo parâmetros propostos pelo guia do INMETRO, que são: limite de detecção (LD); limite de quantificação (LQ); curvas analíticas (calibração externa no solvente e superposição na matriz); faixa linear; exatidão (através de ensaio de recuperação), precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e seletividade (INMETRO, 2020).

3.2.8.1 *Curvas Analíticas e Linearidade*

As curvas analíticas foram preparadas em 9 níveis de concentração para cada agrotóxico. Foi empregada calibração externa utilizando o solvente para avaliação da faixa linear instrumental e superposição da matriz para avaliação da faixa linear do método. Os dados de regressão linear foram obtidos com o auxílio do software GCMS Solutions.

3.2.8.2 *Limite de Detecção e Limite de Quantificação*

Os limites foram avaliados através do método visual, sendo definido como LQ a menor concentração da curva analítica na qual é obtida uma relação $s/n \geq 10$ e LD a concentração do LQ dividida por 3,3. Uma vez definidos os limites instrumentais, para a definição dos limites de quantificação do método, as amostras foram fortificadas nas concentrações equivalentes ao LQ do instrumento e submetidas ao procedimento de extração, de modo a confirmar experimentalmente esses valores.

3.2.8.3 *Exatidão*

A exatidão do método foi avaliada por meio da adição de quantidades conhecidas dos analitos em amostras de urina, sendo que, foi feito um branco da amostra para avaliar a presença de algum dos analitos. As fortificações foram realizadas em 5 níveis de concentração, onde os ensaios foram realizados em triplicata para cada nível. A avaliação da exatidão foi feita em termos de recuperação, conforme é demonstrado na **Error! Reference source not found.**

Equação 1

$$R (\%) = \frac{A_{\text{fortificação}} - A_{\text{branco}}}{A_{\text{extrato}}} \times 100$$

Onde:

R = Recuperação

$A_{\text{fortificação}}$ = Média das áreas da amostra fortificada

A_{extrato} = Média das áreas do padrão no extrato

A_{branco} = Média das áreas da amostra não fortificada

3.2.8.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada por meio da repetibilidade e precisão intermediária, expressas pelo RSD. Para repetibilidade, as amostras foram fortificadas em no mínimo 5 níveis de concentração; onde os ensaios são realizados em triplicata para cada nível no mesmo dia, pelo mesmo analista e nas mesmas condições cromatográficas. A precisão intermediária foi realizada de modo semelhante, entretanto o procedimento de extração foi realizado em dias diferentes. Para os cálculos do RSD foi utilizada a **Error! Reference source not found.**

Equação 2

$$\text{RSD (\%)} = \frac{s}{X} \times 100$$

Onde:

s = Estimativa do desvio padrão absoluto

X= Média das replicatas

3.2.9 Resíduos

Todos os resíduos gerados nesse trabalho foram recolhidos, armazenados em frascos vidros âmbar, rotulados de acordo com as normas definidas pela FURG e armazenados na própria unidade para recolhimento e tratamento por empresa contratada para essa finalidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da técnica SILLME de preparo de amostra

As condições iniciais empregadas da técnica SILLME para a extração de epoxiconazol, hexaconazol e penconazol foram baseadas em estudo prévio desenvolvido e validado para extração de conservantes em alimentos processados (Arias *et al.*, 2021). Com o intuito de alcançar as maiores recuperações para os triazóis em amostras de urina, algumas condições do método foram modificadas, conforme descrito no item **Error! Reference source not found.** Para a otimização, foi empregada uma amostra de urina aleatória como matriz, fortificada na concentração de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, em triplicata, além de uma amostra em branco, para preparo dos padrões no extrato e verificação de possíveis interferentes. Os resultados para esta avaliação podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5: Avaliação de extração dos triazóis em amostras de urina humana empregando SILLME. Experimentos foram realizados utilizando 1g de amostra, 4 mL de água ultrapura, 1 mL de acetonitrila e 2 g de MgSO_4

Analitos	Recuperação (%)			Média	RSD (%)
	Extração 1	Extração 2	Extração 3		
Epoxiconazol	112	111	121	115	4,6
Hexaconazol	130	121	133	128	4,7
Penconazol	121	116	127	121	4,6

Pode ser observado que a média dos resultados de recuperação para dois dos três compostos ficou fora da faixa recomendada pelos guias de validação nacionais e internacionais (70 – 120%). Com o objetivo de melhorar estes resultados e obter menores limites para o método, foi feita a avaliação da massa de amostra.

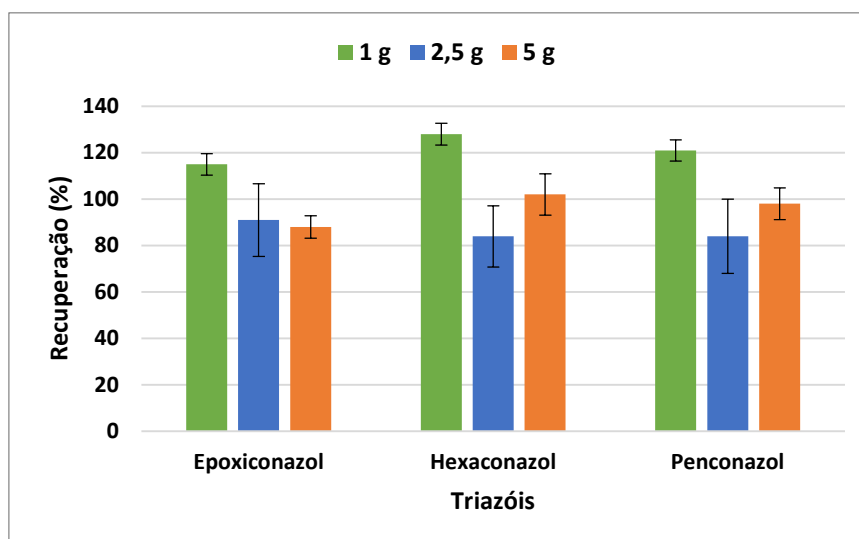
4.1.1 Avaliação da massa de amostra

Na otimização da massa de amostra, buscou-se o aumento no fator de concentração e o eficiente particionamento das fases. Ao avaliar o volume de amostra, testou-se aumentá-la de 1 g para 2,5 g e 5 g. O procedimento realizado se manteve o mesmo, com todos os parâmetros fixos e somente variando a massa de amostra. As extrações foram em triplicata, e os resultados obtidos através de ensaios de recuperação estão apresentados na **Error! Reference source not found.** Para os testes com 1 g e 2,5 g de amostra, foram adicionados 4 g e 2,5 g de água ultrapura. Essa adição de água foi realizada para manter a proporção 5:1 amostra/solvente.

Para 1 g de amostra, as recuperações variaram de 115 a 121%, para todos os agrotóxicos, com $RSD \leq 5\%$. Utilizando 2,5 g de amostra, as recuperações variaram de 84 a 91%, com $RSD \leq 17\%$. Utilizando 5 g, as recuperações variaram de 88 a 102%, com $RSD \leq 10\%$.

Os agrotóxicos foram extraídos com sucessos da amostra de urina em todas as avaliações, com recuperações entre 70 a 120% e $RSD \leq 20\%$, conforme os guias de validação recomendam. Dessa forma, optou-se por trabalhar com a massa de 5 g de urina, com o objetivo de obter LQs mais baixos.

Figura 2: Influência da massa de amostra na recuperação dos triazóis em amostras de urina humana. Experimentos foram realizados utilizando 4mL de água ultrapura, 1mL de acetonitrila e 2g de $MgSO_4$. As barras de erros indicam RSD (%).

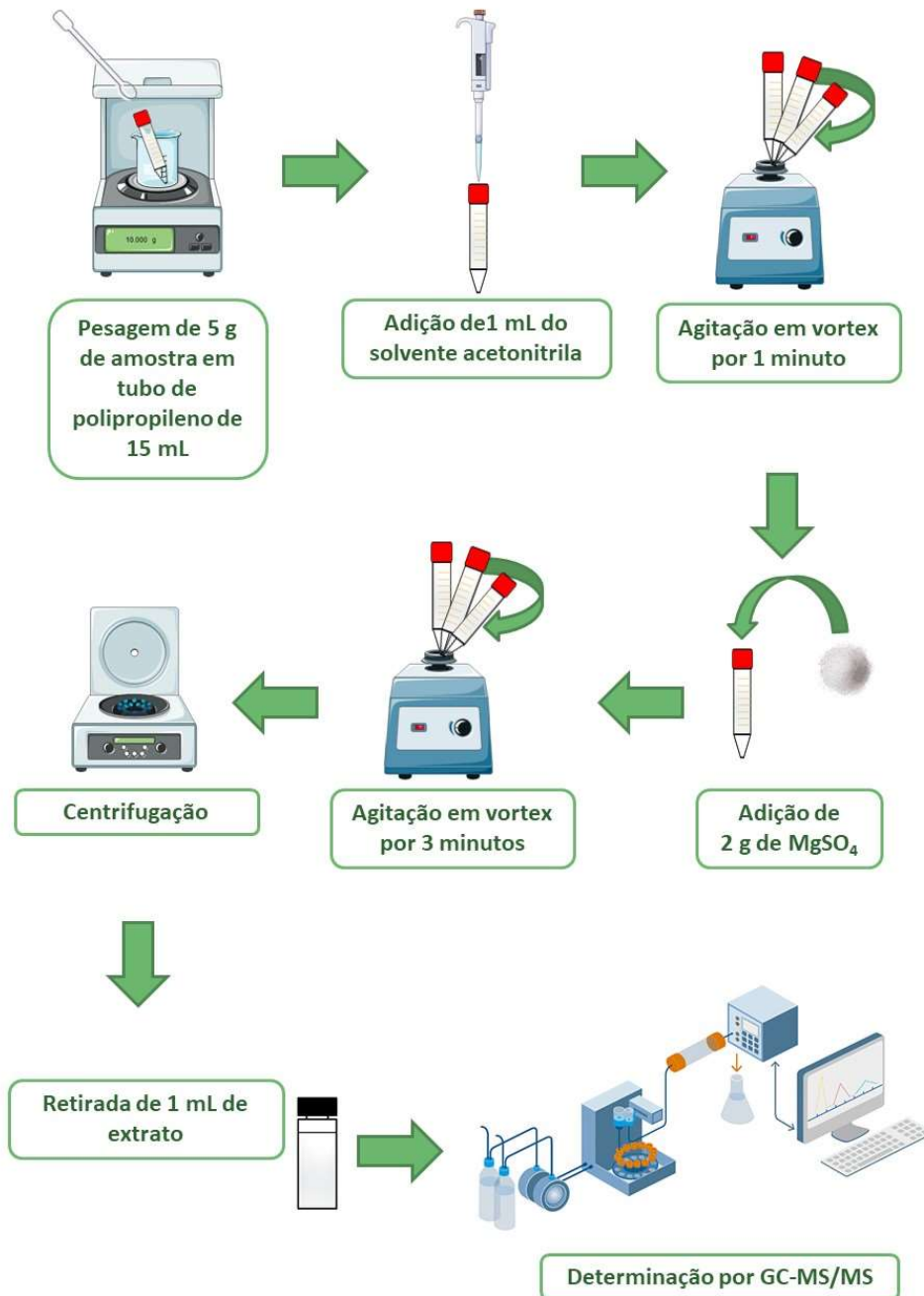


4.2 Método padronizado

A partir dos testes realizados, foi possível avaliar as melhores condições para extração e determinação dos triazóis em amostras de urina. As etapas do procedimento padronizado estão descritas na **Error! Reference source not found.** O método consiste na extração da amostra com um pequeno volume de acetonitrila e partição pela adição de $MgSO_4$, para posterior determinação por GC-MS/MS.

O método padronizado passou pelo processo de validação para garantir a confiabilidade dos resultados.

Figura 3: Esquema do método SILLME padronizado para determinação de triazóis em urina humana



4.3 Validação do método

O método foi validado seguindo parâmetros propostos pelo guia do INMETRO, que são: limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), curva analítica (calibração externa na matriz), exatidão, precisão e seletividade (INMETRO, 2020).

4.3.1 Curva analítica e linearidade

As curvas de calibração foram preparadas em 9 níveis de concentração para cada agrotóxico. Foram preparadas soluções trabalho contendo a mistura dos analitos, e através de diluições sucessivas destas soluções, foram construídas as curvas na matriz.

A linearidade do método foi avaliada pela equação da regressão linear e os dados de regressão foram obtidos com o auxílio do software do equipamento.

A Tabela 6 apresenta os resultados das curvas de calibração preparadas no extrato da matriz. As curvas foram construídas na faixa de 1 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o Epoxiconazol e Penconazol, e na faixa de 5 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o Hexaconazol. Os coeficientes de correlação das curvas variaram de 0,996 a 0,999.

A linearidade corresponde a capacidade de um método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração dos analitos em estudo, dentro de uma determinada faixa de resposta. Os resultados obtidos nas curvas avaliadas estão dentro da faixa recomendada por órgãos regulamentadores como o INMETRO, que recomenda que os coeficientes tenham que ser maiores de 0,90 e próximos a um para garantir a linearidade dos resultados encontrados (INMETRO, 2020).

Tabela 6: Limite de detecção instrumental (LDi), limite de quantificação instrumental (LQi), limite de detecção do método (LDm), limite de quantificação do método (LQm), faixa linear, coeficiente angular (a), intercepto (b), coeficiente de determinação (R^2) para curva analítica preparada no extrato.

Analito	$\mu\text{g L}^{-1}$		ng g^{-1}		Faixa de Trabalho		Curva no Extrato		
	LDi	LQi	LDm	LQm	$\mu\text{g L}^{-1}$	ng g^{-1}	a	b	R^2
Epoxiconazol	0,30	1,0	0,06	0,2	1 - 100	0,2 - 20	60,552	31,1702	0,998
Hexaconazol	1,51	5,0	0,30	1,0	5 - 100	1 - 20	8,2099	-3,528691	0,992
Penconazol	0,30	1,0	0,06	0,2	1 - 100	0,2 - 20	49,858	-7,944106	0,999

4.3.2 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção instrumental (LDi) e quantificação instrumental (LQi) foram obtidos por meio da curva de calibração e avaliados pela relação sinal/ruído (s/n) calculada com o auxílio do software do equipamento, sendo estabelecido como LQi as concentrações na qual a relação $s/n \leq 10$ e para LDi foi a concentração do LQi dividida por 3,3. Para avaliar o limite de quantificação do método (LQm), foi considerado todo o procedimento de extração, onde é considerado um fator de pré-concentração de 5 vezes. Então, o primeiro ponto da curva de calibração com recuperações entre 50 a 120% e desvio padrão relativo (RSD) $\leq 20\%$ foi definido como LQm. Os valores obtidos de LQi, LDi, LQm e LDm são apresentados na Tabela 6.

4.3.3 Exatidão e Precisão

Para avaliar a exatidão do método SILLME foram realizados ensaios de recuperação em 5 níveis, nas concentrações 0,2, 1,0, 2,0, 10,0 e 20,0 ng g⁻¹. A precisão do método foi avaliada em termos de desvio padrão relativo (RSD), nos mesmos níveis. Ambos os ensaios foram realizados em termos de repetibilidade e reprodutibilidade.

A validação do método SILLME foi realizada utilizando uma amostra de urina aleatória como matriz. A Tabela 7 apresenta os dados de exatidão e precisão em termos de repetibilidade.

As recuperações ficaram entre 87 e 112% para o Epoxiconazol, 89 e 109% para o Hexaconazol e 87 e 103% para o Penconazol. Os desvios ficaram menores que 10% para todos os compostos. Já a Tabela 8, apresenta os dados de exatidão e precisão em termos de precisão intermediária, ou seja, as extrações foram realizadas da mesma forma, porém em dias diferentes. As recuperações ficaram entre 103 e 114% para o Epoxiconazol, 101 e 108% para o Hexaconazol e 100 e 112% para o Penconazol. Os desvios ficaram menores que 13% para todos os compostos. Importante salientar que o Hexaconazol não foi avaliado no primeiro nível de 0,2 ng g⁻¹, pois seu limite de quantificação é de 1 ng g⁻¹.

Tabela 7: Exatidão e precisão em termos de repetibilidade.

Analitos	Nível de fortificação (ng g ⁻¹)									
	0,2		1		2		10		20	
	R(%)	RSD (%)	R(%)	RSD (%)	R(%)	RSD (%)	R(%)	RSD (%)	R(%)	RSD (%)
Epoxiconazol	87	7,2	112	3,1	87	6,3	100	7,4	105	7,2
Hexaconazol	n.d.	n.d.	95	8,3	89	7,6	109	1,6	95	3,4
Penconazol	95	8	101	2,6	87	0,9	103	1,2	95	2,9

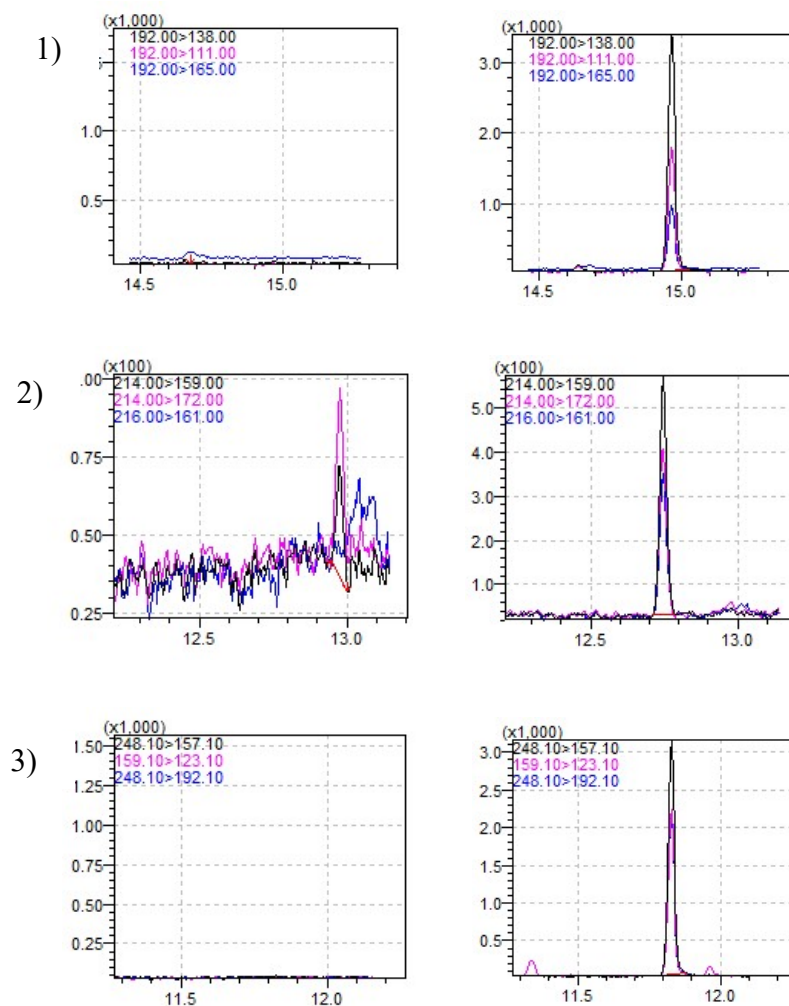
Tabela 8: Exatidão e precisão em termos de precisão intermediária.

Analitos	Nível de fortificação (ng g ⁻¹)									
	0,2		1		2		10		20	
	R(%)	RSD (%)	R(%)	RSD (%)	R(%)	RSD (%)	R(%)	RSD (%)	R(%)	RSD (%)
Epoxiconazol	114	12,5	104	0,5	104	2,1	103	4,3	104	1,9
Hexaconazol	n.d.	n.d.	108	4,3	91	10,8	101	60	103	3,5
Penconazol	100	12	112	4,7	100	4,7	105	2,9	102	2,3

4.3.4 Seletividade

A seletividade foi avaliada com as injeções de extratos de amostras branco (sem a presença dos compostos avaliados no estudo) e amostras fortificadas na concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Comparou-se os cromatogramas de cada agrotóxico a fim de verificar se algum interferente poderia estar coeluinto com os analitos em estudo, conforme observa-se na Figura 4. A detecção por espectrômetro de massas em série já é seletiva por si só, pois a análise é realizada a partir de fragmentos de massas característicos de cada analito.

Figura 4: Cromatogramas do branco e padrão no extrato para cada agrotóxico. (1 – Epoxiconazol, 2 – Hexaconazol e 3 – Penconazol)



4.4 Aplicabilidade

Após a validação, o método foi utilizado no trabalho de doutorado da aluna Julia Pentead, do Programa de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, orientado pela Prof. Dra. Ana Luiza Muccillo Baisch.

Este estudo foi realizado entre agosto e setembro de 2019, seguindo as normas éticas propostas pela resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde, que regulamenta a pesquisa com seres humanos. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Saúde da FURG, pelo número 55/2019.

4.5 Comparação com outros métodos da literatura

A Tabela 9 apresenta uma breve comparação do método proposto com alguns encontrados na literatura para determinação de agrotóxicos em amostras de urina.

Com os dados ilustrados na tabela, pode-se observar que a SILLME apresenta LQs, exatidão e precisão semelhante ao que vem sendo encontrado por outros trabalhos, além de algumas vantagens como rapidez, ser realizada em poucas etapas, utiliza baixos volumes de solvente e de amostra, nem um tratamento prévio a extração.

Técnicas como a SPE, tem sido proposta para a determinação de diferentes classes de agrotóxicos em urina. Embora seja uma técnica consolidada, normalmente demanda um volume maior de solventes, requer aparatos específicos, além dos cartuchos utilizados para extração terem um custo elevado.

Combinações de técnicas de extração também estão sendo propostas, como a combinação de SPE e QuEChERS, essas combinações são interessantes pois podem aumentar a eficiência de extração e obter menores limites para o método. Entretanto, o tempo de análise pode aumentar consideravelmente e mais instrumentação é necessária.

Além disso, a grande maioria dos métodos publicados na literatura, realizam etapas prévias ao preparo de amostra, realizando uma reação de precipitação enzimática, onde normalmente, utilizam-se solventes clorados e aumentam o tempo de análise. O método proposto utiliza um solvente extrator com baixa toxicidade, como a acetonitrila. A redução ou substituição de solventes orgânicos tóxicos é um dos principais princípios da Química Analítica Verde, juntamente com uma melhoria na segurança do analista e uma redução no volume da amostra. Portanto, o método proposto atende adequadamente a esses princípios.

Tabela 9: Comparação do método proposto nesse trabalho com outros métodos empregados para determinação de agrotóxicos em urina humana.

Analitos	Preparo de amostra	Determinação	Quantidade amostra	Volume solvente	Tempo extração (min)	Exatidão (%)	Precisão (%)	LQm ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
Clorpirifós	dSPE-DLLME ^a	HPLC – UV ^b	10 mL	0,15 mL CCl ₄ ^c , 1,5 mL metanol, 1,0 mL etanol	6	98	1,9	5	Ramin et al., 2019
4 agrotóxicos multiclasse	Pa-SDME/MIL-based ^d	HPLC – DAD ^e	0,15 mL	5 mg MIL ^f + 0,02 mL MeCN ^g	130	70 - 122	3,0 - 17,0	25	Mafra et al., 2021
9 agrotóxicos multiclasse	SLE ^h	GC-MS/MS ⁱ	2 mL	20 mL diclorometano	960	77 - 112	4,9 - 10,6	0,5 - 2,5	Soulard et al., 2022
9 agrotóxicos e metabólitos multiclasse	QuEChERS ^j	UPLC-MS/MS ^k	0,05 mL	0,3 mL isopropanol-metanol (50:50 v:v)	n.i.	80,5 - 120	0,58 - 13,0	0,06 - 39	Mouskeftara et al., 2021
15 agrotóxicos e metabólitos multiclasse	SPE – QuEChERS ^l	HPLC-MS/MS ^m	0,5 mL	5 mL metanol + 0,5 mL MeCN	n.i.	71,5 - 112,6	2,6 - 10	0,05 - 2,91	Fiserová et al., 2021
13 agrotóxicos multiclasse	SPE ⁿ	HPLC-MS/MS	1 mL	6 mL metanol	30	80 - 118	2,0 - 14,0	0,0001 - 0,016	Gao et al., 2022
16 agrotóxicos e metabólitos multiclasse	SPE	UPLC-MS/MS	0,2 mL	2 mL metanol	n.i.	74 - 127	0,86 - 12,25	n.i.	Lu et al., 2022
31 agrotóxicos multiclasse	SPE	HPLC-MS/MS	0,5 mL	1 mL MeCN, 1 mL etanol, 1 mL metanol + diclorometano	n.i.	94 - 138	0,38 - 10,0	1,0 - 10,0	Zhu et al., 2022
Epoxiconazol, hexaconazol e penconazol	SILLME	GC-MS/MS	5 g	1 mL MeCN	10	87 - 112	0,9 – 8,3	0,2 - 1	Este trabalho

^adSPE-DLLME – *dispersive Solid Phase Extraction – Dispersive Liquid Liquid Microextraction*; ^bHPLC-UV - *High Performance Liquid Chromatography with ultraviolet*; ^cCCl₄ – Tetracloreto de Carbono; ^dPa-SDME/MIL-based - *Parallel Single Drop Microextraction/ Magnetic Ionic Liquid - based*; ^eHPLC-DAD - *High Performance Liquid Chromatography with diode array detection*; ^fMIL – *Magnetic Ionic Liquid*; ^gMeCN – *Acetonitrile*; ^hSLE - *supported liquid extraction*; ⁱGC-MS/MS - *Gas Chromatography coupled with tandem mass spectrometry* ^jQuEChERS- *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*; ^kUPLC-MS/MS - *Ultra-high Performance Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry* ^lSPE– *Solid Phase Extraction - QuEChERS- Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*; ^mHPLC-MS/MS - *High Performance Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry*; ⁿSPE – *Solid Phase Extraction*.

5 CONCLUSÃO

O método proposto, empregando SILLME e GC-MS/MS para a determinação de triazóis em urina apresentam valores dentro dos sugeridos nos guias de validação para todas as figuras de méritos avaliadas, com resultados de exatidão variando de 87 a 112 % e precisão de 0,9 a 8,3 %, além de LQs $\geq 1,0 \text{ ng g}^{-1}$, similares a outros trabalhos encontrados na literatura.

Comparado com métodos propostos na literatura para determinação de agrotóxicos em amostras de urina, a SILLME apresenta a vantagem de não necessitar de etapa prévia de tratamento de amostra para extração, por ser uma técnica simples, com poucas etapas. Além disso, ao final da etapa de extração, não é necessário realizar evaporação no extrato final, o que reduz o número de etapas.

O trabalho desenvolvido possui caráter inovador, uma vez que não foram encontrados métodos que realizem a determinação dos compostos estudados em amostras de urina empregando a SILLME. O método é caracterizado por ser simples e rápido, o que minimiza erros, além de ser de baixo custo e ambientalmente correto, pois necessita menor volume de solvente, utilização de solventes menos tóxicos, gera menor exposição ao analista e menor geração de resíduos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, I. SHERIN F. ALAA B. FOTOUH R. A green homogeneous liquid-liquid microextraction method for spectrophotometric determination of daclatasvir in human plasma. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**. 22, 2021.

AGROLINK Plataforma de consulta para informações dos agrotóxicos. <https://www.who.int/topics/pesticides/en/>. Acesso em setembro de 2021.

ALBRECHT, W. Hepatotoxicity of triazole fungicides. **Archives of Toxicology**, 93(10):3037-3038, 2019.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 08 jan. 2002.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. DOU nº141, de 25 de julho de 2017.

ANVISA, Publicada reclassificação toxicológica de agrotóxicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/publicada-reclassificacao-toxicologica-de-agrotoxicos>. Acesso em setembro de 2021.

ANVISA. Programa de análise de registro de agrotóxicos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>, acessada em agosto de 2021.

ANWAR, S. SHAFIQUZZAMAN, S. SHARIFUDIN, S. A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and foodstuffs. **Trends in Food Science and Technology**. 71, 188, 2018.

ARIAS, J; ROCHA, C; Salting-Out Induced Liquid-Liquid Microextraction: an Environmentally Friendly Approach to Preservative Determination in Food Samples. **Food Analytical Methods**, 2021.

BALARDINI, R. Fungicidas sistêmicos: benzimidazóis, triazóis e estrobilurinas. Disponível em: <<https://elevagro.com/materiais-didaticos/fungicidas-sistemicos-benzimidazois-triazois-e-estrobilurinas/>>. Acesso em outubro de 2021.

BINTER, E. BANNIER, D. SAINT-AMOUR, G. SIMON, C. BARILLOT, C. MONFORT, S. CORDIER, F. Exposure of pregnant women to organophosphate insecticides and child motor inhibition at the age of 10–12 years evaluated by fMRI. **Environmental Research**. 188, 1098, 2020.

BORDAGARAY, A.; MILLÁN, E.; GARCIA-ARRONA, R. A Review on Microextraction Techniques for Selected Triazole Fungicides Determination in Water and Food Samples. **J Food Chem Nanotechnol**, v. 2, n. 3, p. 128-137, 2016.

BORDIN, D. MONEDEIRO, F. CAMPOS, E. ALVES, M. BUENO, L. MARTINIS, B. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatographica**, v. 7, p. 125-143, 2015.

BURNS, C. JUBERG D. Cancer and occupational exposure to pesticides: an umbrella review. **International Archives of Occupational and Environmental Health**. 94,945-957, 2021.

CARSON, R. **Primavera Silenciosa**. Ed. Guaia, 2010.

CHEN, D. MIAO, H. ZHAO, Y. WU, Y. A simple liquid chromatography-high resolution mass spectrometry method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in human urine using cold-induced phase separation and hydrophilic pipette tip solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**. 1587, 73-78, 2019.

CHERKASHINA, K. VAKH, C. LEBEDINETS, S. ALEKSEI, P. MOSKVIN, L. LEZOV, A. BULATOV, A. An automated salting-out assisted liquid-liquid microextraction approach using 1-octylamine: On-line separation of tetracycline in urine samples followed by HPLC-UV determination. **Talanta**. 184, 122-127, 2018.

COLLINS, C. BRAGA, G. **Introdução a Métodos Cromatográficos**, 3. ed., Editora da UNICAMP, São Paulo, 1988.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2006.

CONNOLY, A. JONES, K. BASINAS, I. GALEA, K. KENNY, L. MCGOWAN, PY. COGGINS, M. Exploring the half-life of glyphosate in human urine samples. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. 222, 205-210, 2019.

DENGHEL, H. GOEN, T. Simultaneous assessment of phenolic metabolites in human urine for a specific biomonitoring of exposure to organophosphate and carbamate pesticides. **Toxicology Letters**. 298, 33-41, 2018.

DU, D. et al. Salting-out induced liquid-liquid microextraction based on the system of acetonitrile/magnesium sulfate for trace-level quantitative analysis of 129 fluoroquinolones in water, food, and biological matrices by high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector. **Analytical Methods**, 6, 17, 6973-6980, 2014.

DUTTA, A. HINGMIR, S. BANERJEE, K. Multiresidue Analysis of Pesticides in Moringa Pods by GC-MS/MS, and LC-MS/MS. **Journal AOAC**.103,1486-149, 2020.

ECONOMOU, A. et al. Determination of multi-class pesticides in wines by solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1216, 31, 5856-5867, 2009.

ELAHI, E. WEIJUN, C. ZHANG, H. NAZEER, M. Agricultural intensification and damages to human health in relation to agrochemicals: Application of artificial intelligence. **Land Use Policy**. 83, 461-474, 2019.

FIŠEROVA, P. KOHOUTEK, J. DEGREDELE, C. DALVIE, M. KLANOVÁ, J. New sample preparation method to analyse 15 specific and non-specific pesticide metabolites in human urine using LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**. 1166, 122-542, 2021.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 50, 78-84, 2013.

GÁLVEZ N, WAGONER R, BEAMER P, DE ZAPIEN J, ROSALES C. MIGRANT Farmworkers' Exposure to Pesticides in Sonora, Mexico. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. 15, 12, 2651, 2018.

GAO, B. POMA, G. MALARVANNAN, C. DUMITRASCU, C. BASTIAENSEN, M. WANG, M. COVACI, A. Development of an analytical method based on solid-phase extraction and LC-MS/MS for the monitoring of current-use pesticides and their metabolites in human urine. **Journal of Environmental Sciences**. 111, 153 – 163, 2022.

GARCIA, A. Fungicidas I: utilização no controle químico de doenças e sua ação contra os fitopatógenos. **Embrapa Rondônia-Documentos (INFOTECA-E)**, 1999.

GARCIA-GARCIA, C. PARRÓN, T. REQUENA, M. ALARCÓN, R. TSATSAKIS, A. HERNANDEZ, A. Occupational pesticide exposure and adverse health effects at the clinical, hematological, and biochemical level. **Life Sciences**. 15, 145, 274-83, 2016.

GRIGORI, P. Afinal, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxico do mundo? Fiocruz.br. Disponível em: <https://cee.fiocruz.br/?q=node/1002#:~:text=O%20Instituto%20Brasileiro%20do%20Meio,a%20539%2C9%20mil%20toneladas.>>. Acesso em outubro 2021.

GUNNEL, D. EDDLESTON, M. Suicide by intentional ingestion of pesticides: a continuing tragedy in developing countries. **International Journal of Epidemiology**. 32, 902–909, 2003.

HAMMAD, S.F., ABDALLAH, I.A., BEDAIR, A. Salting-out induced liquid–liquid microextraction for alogliptin benzoate determination in human plasma by HPLC/UV. **BMC Chemistry**. 15, 2, 2021.

HARDY, E. DEREMAUX, C. GULDNER, L. BRIAND, O. VANDENTORREN, S. OLEKO, A. ZAROS, C. Hair versus urine for the biomonitoring of pesticide exposure: Results from a pilot cohort study on pregnant women. **Environment International**. 152, 106481, 2021.

HIOKI, K., ITO, Y., OYA, N. *et al.* Intra-individual variations of organophosphate pesticide metabolite concentrations in repeatedly collected urine samples from pregnant women in Japan. **Environ Health Prev Med**. 24, 7, 2019.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Portaria normativa nº 84, de 15 de outubro de 1996. - Art. 3º - A classificação quanto ao potencial de periculosidade ambiental baseia-se nos parâmetros bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico, carcinogênico, obedecendo a seguinte graduado.

INMETRO. Brasília: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre validação de métodos analíticos**, 2020.

IPEA. Programa Nacional de Defensivos Agrícolas. Documento Básico. Brasília, 1975.

IQBAL, S. IQBAL, M. JAVED, M. BAHABUR, A. YASIEN, S. AHMAN N. Modified QuEChERS extraction method followed by simultaneous quantitation of nine multi-class pesticides in human blood and urine by using GC-MS. **Journal of Chromatography B**. 1152, 2020.

ISSA, M. TAHA, S. EL-MARSAFY, A. KHALIL, M. ISMAIL, E. Acetonitrile-Ethyl acetate-based method for the residue analysis of 373 pesticides in beeswax using LC-MS/MS and GC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**. 15, 1145-122106, 2020.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**. 2, 1, 13-25, 2010.

KAMRIN, M. A. Triazines and triazoles. **Pesticide profiles toxicity, environmental impact, and fate**. 3-12, 1997.

KHAMIS M. ADAMKO, D. EL-ANEED, A. Mass spectrometric based approaches in urine metabolomics and biomarker discovery. **Mass Spectrometry Review**. 36, 115-134, 2017.

KIM, K. KABIR, E. JAHAN, S. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Science of the Total Environment**. 575, 525-535, 2017.

KRIEGER, R. Pesticide exposure assessment. **Toxicology Letters**. 82-83, 65-72, 1995.

LI, X. YANG, X. ZHENG, X. BAI, M. HU, D. Review on Structures of Pesticide Targets. **International Journal of Molecular Sciences**. 21, 7144, 2020.

LOPES, C. ALBUQUERQUE, G. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**. 42, 518-534, 2018.

LU, Q. LIN, N. CHENG, X. YUAN, T. ZHANG, Y. GAO, Y. XIA, Y. MA. Y. TIAN, Y. Simultaneous determination of 16 urinary metabolites of organophosphate flame retardants and organophosphate pesticides by solid phase extraction and ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Chemosphere**. 300, 134 – 585, 2022.

MAABOUD, I. MOHAMMED, H. MOUSA, A. Simultaneous determination of dorzolamide and timolol in aqueous humor: A novel salting out liquid–liquid microextraction combined with HPLC. **Talanta**. 130, 495-505, 2014.

MACHADO, S. SOUZA, B. MARCIANO, L. PEREIRA, A, CARVALHO, D. MARTINS, I. A sensitive and accurate vortex-assisted liquid-liquid microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method for urinary triazoles. **Journal of Chromatography A**. 1586, 9-17, 2019.

MAFRA, G. WILL, C. MERIB, J. CARASEK, E. A proof-of-concept of parallel single-drop microextraction for the rapid and sensitive biomonitoring of pesticides in urine. **Journal of Separation Science**. 44, 9, 1961 – 1968, 2021.

MAPA. Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animais/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>, acesso em setembro de 2021.

MATKOVICH, C. CHRISTIAN, G. Salting-out of acetone from water. Basis of a new solvent extraction system. **Analytical Chemistry**. 45, 11,1915-1921, 1973.

MEDEIROS, J. ACAYABA, R. MONTAGNER, C. A Química na avaliação do impacto à saúde humana diante da exposição aos pesticidas. **Química Nova**. 584-598, 2021.

MEIRA, A. P. G.; Técnicas de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal: uma revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**. 2, .766-777, 2015.

MEKONEN, S. ARGAW, R. SIMANESEW, A. HOUBRAKEN, M. SENARVE, D. AMBELU, A. SPANOGHE, P. Pesticide residues in drinking water and associated risk to consumers in Ethiopia. **Chemosphere**. 60, 162-252, 2016.

MORENO-GONZÁLEZ, D. GARCÍA-CAMPAÑA, A. Salting-out assisted liquid– liquid extraction coupled to ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of tetracycline residues in infant foods. **Food Chemistry**. 221, 1763-1769, 2016.

MOUSKEFTARA, T. VIRGILIOU, C. IAKOVAKIS, A. RAIKOS, N. GIKA, H. Liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of nine insecticides and fungicides in human postmortem blood and urine. **Journal of Chromatography B**. 1179, 122-824, 2021.

PANTELIS, C. DELPLANCKE, T. MAKRIS, K. C. Cohort-friendly protocol for the determination of two urinary biomarkers of exposure to pyrethroids and neonicotinoids using gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**. 411, 20, 5013–5021, 2019.

PERSONNE, S. MARCELO, P. PILARD, S. BALTORA-ROSSET, S. CORONA, A. ROBIDEL, F. LECOMTE, A. BROCHOT, C. BACH, V. Determination of maternal and foetal

distribution of cis- and trans-permethrin isomers and their metabolites in pregnant rats by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Analytical and bioanalytical chemistry**. 411, 8043-8052, 2019.

PIAO, C.; CHEN, L.; WANG, Y. A review of the extraction and chromatographic determination methods for the analysis of parabens. **Journal of Chromatography B**, v. 969, p. 139-148, 2014.

PIRARD, C. REMY, S. GIUSTI, A. CHAMPON, L. CHARLIER, C. Assessment of children's exposure to currently used pesticides in wallonia, Belgium, **Toxicology Letters**. 329, 1-11, 2020.

PRESTES O. D, FRIGGI C.A, ADAIME M.B., ZANELLA R. QuEChERS—A Modern Sample Preparation Method for Pesticide Multiresidue Determination in Food by Chromatographic Methods Coupled to Mass Spectrometry. **Química Nova**. 32, 6, 1620, 2009.

PUBCHEM <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>> acessado em outubro de 2021

RAMIN, M. OMIDI, F. KHADEM, M & SHAHTAHERI, S. Combination of dispersive solid-phase extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography for trace determination of chlorpyrifos in urine samples. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**. 101, 6, 810-820, 2019.

RATANACHINA, J. MATTEIS, S. CULLINAN, P. BURNEY, P. Pesticide exposure and lung function: a systematic review and meta-analysis. **Occupational Medicine**. 70, 14-23, 2020.

RAZA, N.; KIM, K. H.; ABDULLAH, M.; RAZA, W.; BROWN, R. J. Recent developments in analytical quantitation approaches for parabens in human-associated samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 2017.

SABARWAL, A. KUMAE, K. SINGH, P. Hazardous effects of chemical pesticides on human health-Cancer and other associated disorders. **Environmental Toxicology Pharmacology**. 63:103-114, 2018.

SINTOX. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. Disponível em: <https://sinitox.icict.fiocruz.br/>, acessada em setembro de 2021.

SKOOG, D. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. Ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SOULARD, P. DEREUMEUX, C. MERCIER, F. Determination of biomarkers of exposure to boscalid, captan, folpel, mancozeb and tebuconazole in urine and hair samples. **MethodsX**. 9, 101-671, 2022.

SWEENEY, C. PARK, Y. KIM, J. Comparison of sample preparation approaches and validation of an extraction method for nitrosatable pesticides and metabolites in human serum and urine analyzed by liquid chromatography – Orbital ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. 1603, 83-91, 2019.

TAIWO, A. A review of environmental and health effects of organochlorine pesticide residues in Africa. **Chemosphere**. 220, 1126-1140, 2019

TAMAR, B. ZOHAR, B. THOMAS, G. HAMAMA, Z. AZELROD, R. LITAL K. SHIMONY, T. GOLDSMITH, R. Organophosphate pesticide exposure in children in Israel: Dietary associations and implications for risk assessment. **Environmental Research**. 182, 1087, 2020.

TSAI, C. LIAO, F. WENG, J. FENG, C. Tandem derivatization combined with salting-out assisted liquid–liquid microextraction for determination of biothiolsin urine by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. 1524, 29– 36, 2017.

ZHANG, T. SONG, S. BAI, X. HE, Y. ZHANG, B. GUI, M. KANNAN, K. LU, S. HUANG, Y. A nationwide survey of urinary concentrations of neonicotinoid insecticides in China. **Environment International**. 132, 1051, 2019.

ZHU, H. CHINTHAKINDI, S. KANNAN, K. A method for the analysis of 121 multi-class environmental chemicals in urine by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. 1646, 462 – 146, 2021.

