

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**PEDRO MARCOS FRUGERI**

**DETERMINAÇÃO DE SULFAGUANIDINA SÓDICA EMPREGANDO O SISTEMA;  
FIA PRÉ-CONCENTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE ORGANOFOSFORADOS  
UTILIZANDO MATERIAL DE ACESSO RESTRITO**

**Alfenas - MG**

**2019**

**PEDRO MARCOS FRUGERI**

**DETERMINAÇÃO DE SULFAGUANIDINA SÓDICA EMPREGANDO SISTEMA FIA;  
PRÉ-CONCENTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE ORGANOFOSFORADOS  
UTILIZANDO MATERIAL DE ACESSO RESTRITO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Alfenas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Analítica. Orientador: Prof. Dr. Pedro Orival Luccas

Alfenas - MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central – Campus Sede

F944d Frugeri, Pedro Marcos.  
Determinação de sulfaguanidina sódica empregando sistema FIA. Pré-concentração e determinação de organofosforados utilizando material de acesso restrito. -- Alfenas/MG, 2019.  
140 f. : il. –

Orientador: Pedro Orival Luccas.  
Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Alfenas, 2019.  
Bibliografia.

1. Sulfaguanidina. 2. Compostos Organofosforados. 3. Métodos de Análise.  
4. Nanotubos de Carbono. 5. Otimização – métodos. I. Luccas, Pedro Orival.  
II. Título.

CDD 543

## Pedro Marcos Frugeri

“Determinação de sulfaguanidina sódica empregando sistema fia; pré-concentração e determinação de organofosforados utilizando material de acesso restrito”.

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Analítica.

Aprovado em: 22/07/2019

Prof. Dr. Pedro Orival Luccas  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –  
UNIFAL-MG

Assinatura: 


Profa. Dra. Cristiana Schmidt Magalhães  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –  
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Jaine Honorata Hortolan Luíz  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –  
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Gisele Simone Lopes  
Instituição: Universidade Federal do Ceará

Assinatura: 

Prof. Dr. Marcos R. L. do Nascimento  
Instituição: Comissão Nacional de Energia  
Nuclear

Assinatura: 

*Dedico este trabalho a minha família, pelo apoio e compreensão em todos os momentos, principalmente, nos ausentes.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, que me proporcionou essa grande experiência.

Ao Prof. Dr. Pedro Orival Luccas, pela confiança, orientação e amizade, por ter me dado a oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa, se não fosse isso, não seria possível a conclusão deste trabalho.

Ao Instituto de Química da UNIFAL, pela oportunidade concedida.

A todos os professores, funcionários e colegas do Curso de Pós-Graduação em Química.

A grande amiga Ayla, que conheço desde 2008, pela paciência e ensinamentos, que é e sempre será uma pessoa importante para mim.

A minha família por todo amor e compreensão pela ausência em vários momentos durante este caminho. Em especial, a minha esposa e meus filhos, que sempre entenderam a importância deste trabalho na minha vida.

As funcionárias da Jofadel Ind. Farmacêutica, Éryka e Nazaré que sempre colaboraram na minha ausência.

Ao meu amigo Raphael Antônio pela imensa ajuda.

A todos que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

Ao Cidinho, Cida e Anita, pelo enorme companheirismo nos últimos 16 anos (*in memoriam*).

À CAPES pelo apoio nas pesquisas.

*“Porque eu sou do tamanho do  
que vejo e não do tamanho da  
minha altura [...]”*

(PESSOA, 1914)

## RESUMO

A presente tese descreve o desenvolvimento de dois métodos analíticos: I - Sistemas de análise em fluxo para a determinação de sulfaguanidina sódica em amostras farmacêuticas e alimentícias e II - Determinação de pesticidas organofosforados, em amostras alimentícias, empregando material magnético de acesso restrito para a pré-concentração. Na primeira análise, o método se baseou na reação da sulfaguanidina com íon nitrônio e N-naftietilenodiamina para produzir um complexo colorido, cuja absorvância foi monitorada em 545 nm. O sistema foi otimizado, utilizando um planejamento fatorial fracional  $2^{7-2}$  e matriz de Doehlert. O método desenvolvido foi aplicado em amostras de medicamentos e alimentos (ovo, leite e fígado de frango). Os possíveis interferentes foram avaliados por técnica multivariada e representados em gráficos de probabilidade, não indicando interferências significativas para um nível de confiança de 95%. O método apresentou limites de detecção e quantificação de  $0,012 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,039 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente, frequência analítica de 30 leituras  $\text{h}^{-1}$  e boa precisão expressa por desvio padrão relativo inferior a 4,0%. Os resultados foram concordantes com os obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, atestando a exatidão do método proposto. Na segunda análise, foi sintetizado um material magnético de acesso restrito (M-RACNT), para extrair pesticidas organofosforados de amostras de alimentos com teor proteico. A magnetização do material favorece a separação em fase dispersiva, visto que os nanotubos de carbono são de difícil separação em meio aquoso. Sendo assim, com o auxílio de um campo magnético externo (ímã), foi possível separar o material sorvente da amostra. Por outro lado, a camada de albumina sérica que reveste os nanotubos de carbono forma uma barreira física, impedindo que as proteínas presentes na matriz adsorvam o material. No entanto, os organofosforados, por serem moléculas de menor tamanho, conseguem migrar e serem adsorvidos pelos M-RACNTs, garantindo, assim, sua extração da matriz. O material desenvolvido foi capaz de excluir aproximadamente 100% das proteínas presentes no meio, teste esse confirmado por experimentos de exclusão proteica. Posteriormente ao processo de extração em fase sólida, as amostras foram verificadas, utilizando um sistema de análise em fluxo com detecção espectrofotométrica (560 nm). O sistema foi otimizado, usando um planejamento fatorial fracional  $2^{6-2}$  e matriz de Doehlert. O método foi aplicado para a determinação de pesticidas organofosforados em cinco amostras de alimentos (brócolis, berinjela, couve-flor, leite de soja e vagem verde). Quanto às figuras de mérito, o método apresentou faixa linear entre  $5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  e  $90 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , limite de detecção de  $0,74 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , limite de quantificação de  $2,44 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , fator de pré-concentração de 271 vezes e RSD inferior a 3,67%. A exatidão do método foi avaliada em comparação com a técnica por cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados foram condizentes (*teste-t*,  $p = 0,05$ ).

**Palavras-chave:** Sulfaguanidina Sódica. Organofosforados. Sistema de Análise em Fluxo. Nanotubos de Carbono Magnéticos de acesso restrito. Otimização Multivariada.

## ABSTRACT

This thesis describes the evolution of two analytic methods: I- Systems of flow injection analysis for determining the sodium sulfaguanidine in pharmaceutical and food samples and II - The determination of organophosphates' pesticides, in food samples, using magnetic material of restrict access for pre concentration. In the first analysis, the method based itself on the reaction of sulfaguanidine with nitric ion and n-naphthylethylenediamine to produce a colored complex, which the absorbance was monitored in 545 nm. The system was optimized, using a fractional factorial planning  $2^{7-2}$  and Doehlert matrix. The method was applied in samples of medicines and food (egg, milk and chicken's liver). The possible interfering were evaluated by multivariate technique and represented in probability's graphics, and there were no significant interferences in a reliable level of 95%. The method showed us limits in detecting and quantifying in  $0.012 \text{ mg. L}^{-1}$  and  $0.039 \text{ mg. L}^{-1}$ , respectively, analytic frequency of 30 readings.h<sup>-1</sup> and good accuracy demonstrated by relative standard deviation under 4.0%. The results agreed to the results obtained by the technique of high-performance liquid chromatography, testing the method's accuracy. In the second analysis, it was synthesized a magnetic material of restrict access (M-RACNT), to extract the organophosphates' pesticides of food samples with high protein level. The material's magnetization auxiliates the division in dispersive phase, as the carbon nanotubes are hard to divide in water environment. Thus, with the help of a magnet, it was possible to separate the sample's sorbent material. On the other hand, the serum albumin which covers the carbon nanotubes constitutes a physical barrier, stopping the proteins to absorb the material. However, the organophosphates, for being smaller molecules, can migrate and be absorbed by M-RACNTs, ensuring the extraction of the matrix. The material resulted was capable of excluding about 100% of the proteins in the environment, this test was ensured by experiments of protein removal. Later to the process in solid stage, the samples were checked, using a system of flow injection analysis with spectrophotometric (560 nm). The system was optimized, using a fractional factorial planning  $2^{6-2}$  and Doehlert matrix. The method was applied to determine organophosphates' pesticides in five food samples (broccoli, eggplant, cauliflower, soy milk and beans). In relation to the merit, the method presented a linear range between  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $90\mu\text{g. L}^{-1}$ , limit of detection of  $0,74 \mu\text{g. L}^{-1}$ , limit of quantification of  $2,44 \mu\text{g L}^{-1}$ , pre concentration factor 271 times under and RSD inferior to 3.67%. The accuracy of the method was evaluated in comparison to the technique of high-performance liquid chromatography. The results were consistent (*test-t*,  $p = 0,05$ ).

**Keywords:** Sodium Sulfaguanidine. Organophosphates. System of Flow injection Analysis. Magnetic Carbon Nanotubes of restrict access. Multivariate Optimization.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Vendas de produtos formulados divididos por classe no Brasil em 2013 (IBAMA - 2013).....	44
Tabela 2: Exemplos de pesticidas organofosforados de acordo com os grupamentos éster ligados ao átomo de fósforo.....	47
Tabela 3: Classificação da dose letal de agrotóxicos no Brasil.....	47
Tabela 4: Formulações/amostras contendo sulfaguanidina sódica com os seus respectivos valores nominais declarados pelos fabricantes.....	57
Tabela 5: Níveis dos fatores no planejamento Fatorial Fracionário $2^{7-2}$ .....	62
Tabela 6: Níveis codificados e reais da Matriz de Doehlert para três fatores.....	64
Tabela 7: Grupos e Planejamento Fatoriais dos interferentes.....	67
Tabela 8: Grupo A: Planejamento Fatorial Fracionário $2^3$ - Concentração dos interferentes	67
Tabela 9: Grupo B: Planejamento Fatorial Fracionário $2^4$ - Concentração dos interferentes	68
Tabela 10: Grupo C: Planejamento Fatorial Fracionário $2^3$ - Concentração dos interferentes	68
Tabela 11: Grupo D: Planejamento Fatorial Fracionário $2^{7-2}$ - Concentração dos interferentes.....	68
Tabela 12: Aplicação do método validado para determinação de sulfaguanidina sódica em diferentes amostras.....	80
Tabela 13: Comparação de diferentes métodos analíticos para a determinação de sulfonamidas em diferentes tipos de amostras.....	80
Tabela 14: Níveis dos fatores no planejamento Fatorial Fracionário $2^{6-2}$ , usando uma solução com a mistura dos organofosforados (clorpirifós, diazinon, malation, metamidofós e paration) na concentração final de 50 mg. L <sup>-1</sup> .....	85
Tabela 15: Otimização Univariada para a relação do reagente ácido acético/ácido clorídrico-----	86
Tabela 16: Níveis dos fatores no planejamento Fatorial Fracionário $2^{5-2}$ para a mistura dos organofosforados Clorpirifós, Diazinon, Malation, Paration e Metamidofós na concentração final de 100 µg L <sup>-1</sup> .....	93
Tabela 17: Planejamento Matriz de Doehlert das variáveis mais significativas e os níveis codificados para a mistura dos organofosforados na concentração final de 100 µg. L <sup>-1</sup> .....	94

Tabela 18: Planejamento Matriz de Doehlert utilizada para a mistura dos organofosforados Clorpirifós, Diazinon, Malation, Paration e Metamidofós com uma concentração final de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....	94
Tabela 19: Amostras de alimentos e seus respectivos teores de proteína.....	95
Tabela 20: Valores otimizados para as variáveis do Planejamento Fatorial Fracionário $2^{6-2}$ para o método de análise em fluxo.....	104
Tabela 21: Valores otimizados para os pontos de máximo no Planejamento Matriz de Doehlert para os organofosforados analisados nas etapas de pré-concentração .....	111
Tabela 22: Características analíticas obtidas usando o material M-RACNT com o método FIA proposto .....	113
Tabela 23: Comparação de diferentes métodos analíticos para a determinação de organofosforados em diferentes tipos de amostras .....	113
Tabela 24: Aplicação e validação do método para a determinação de organofosforados em amostras diversas .....	114

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sistema de análise em fluxo por confluência, R1, R2 e R3 reagentes; T solução transportadora; C1, C2 e C3 confluências para adição de reagentes; R1 e R2, bobinas reacionais.....	24
Figura 2: A) Esquema de um nanotubo de carbono de parede simples. ....	28
Figura 2: B) Diferentes tipos de nanotubo de carbono .....	28
Figura 3: A) Esquema de um nanotubo de carbono de parede dupla. ....	29
Figura 3: B) Ilustração de nanotubo de carbono de parede simples (SWCNT) e de paredes múltiplas (MWCNT), com diferentes tamanhos nas larguras e comprimentos .....	29
Figura 4: Esquema da funcionalização ácida na superfície dos CNTs .....	30
Figura 5: Esquema do mecanismo de sorção de íons metálicos divalentes na superfície dos CNTs.....	31
Figura 6: Representação esquemática da formação de compósito híbridos a base de nanotubos de carbono e nanopartículas magnéticas.....	31
Figura 7: Mostra o nanotubo de carbono oxidado (NTC), posteriormente com as nanopartículas magnéticas e com o recobrimento pela BSA (RAN-CNT).....	32
Figura 8: Esquema de extração em fase sólida usando CNTs magnéticos .....	33
Figura 9: Estrutura geral das penicilinas.....	35
Figura 10: Compostos penicilânicos com diferenças nas suas estruturas .....	36
Figura 11: Exemplos de compostos na mesma classe de Antibióticos Glicopeptídeos.....	37
Figura 12: Exemplos de compostos na mesma classe de Antibióticos Aminoglicosídeos .....	37
Figura 13: Exemplos de compostos na mesma classe de antibióticos das Rifamicinas .....	39
Figura 14: Estrutura geral de uma sulfonamida.....	40
Figura 15: Exemplos de compostos da mesma classe de antibióticos das sulfonamidas .....	41
Figura 16: Número de publicações nos últimos 20 anos no Web Science Direct com as seguintes palavras-chave: “métodos analíticos para determinação de sulfas”.....	43
Figura 17: Fórmula geral dos organofosforados. R1 e R2 radicais alquil ou aril.....	46
Figura 18: Estruturas de alguns pesticidas utilizados na agropecuária brasileira.....	48
Figura 19: Número de publicações nos últimos 20 anos no Science Direct com as seguintes palavras-chave: “métodos analíticos para determinação de organofosforados” ....	52
Figura 20: Célula de fluxo de quartzo ES, (Hewlett Packard, EUA) .....	55
Figura 21: Injetor comutador utilizado no sistema de análise em fluxo .....	56

Figura 22:	Diagrama esquemático do sistema de análise em fluxo para determinação de sulfaguanidina sódica.....	60
Figura 23:	Reações químicas que ocorrem ao longo do percurso analítico no sistema FIA para a determinação de sulfaguanidina sódica .....	61
Figura 24:	Varredura espectral do composto obtido a partir da reação com uma solução de sulfaguanidina sódica na concentração de 0,01% (m/v) .....	69
Figura 25:	Diagrama de Pareto para as variáveis estudadas. Nível de confiança de 95% .	70
Figura 26: A)	Superfície de Resposta: sulfamato de amônio x Nitrito de sódio .....	72
Figura 26: B)	N-naftil-etilenodiamina x nitrito de sódio .....	72
Figura 26: C)	N-naftiletilenodiamina x sulfamato de amônio.....	73
Figura 27:	Efeito do tamanho da alça de amostragem sobre a absorbância. Experimento realizado com 5,5 mg. L <sup>-1</sup> de sulfaguanidina sódica.....	75
Figura 28:	Influência do comprimento do Reator 2 na absorbância - Experimento realizado com 5,5 mg. L <sup>-1</sup> de sulfaguanidina sódica.....	76
Figura 29: A)	Probabilidade dos resultados obtidos com a aplicação das matrizes experimentais no estudo de interferentes para sulfaguanidina sódica no Planejamento Fatorial Fracionário 2 <sup>3</sup> : 1-enxofre; 2- sulfato de neomicina e 3-caulin.....	77
Figura 29: B)	Probabilidade dos resultados obtidos com a aplicação das matrizes experimentais no estudo de interferentes para sulfaguanidina sódica no Planejamento Fatorial Fracionário 2 <sup>4</sup> : 1-amido; 2-carbonato de cálcio; 3-celulose; 4-lactose.....	77
Figura 29: C)	Probabilidade dos resultados obtidos com a aplicação das matrizes experimentais no estudo de interferentes para sulfaguanidina sódica no Planejamento Fatorial Fracionário 2 <sup>3</sup> : albumina bovina; 2-ácido láctico; 3-caseína .....	77
Figura 29: D)	Probabilidade dos resultados obtidos com a aplicação das matrizes experimentais no estudo de interferentes para sulfaguanidina sódica no Planejamento Fatorial Fracionário 2 <sup>7-2</sup> : 1-ampicilina; 2-norfloxacino; 3-flunixin; 4-penicilina G procaína; 5- trimetoprima; 6- penicilina G potássica; 7-estreptomicina.....	77
Figura 30:	Curva analítica para a determinação de sulfaguanidina sódica com o sistema FIA proposto.....	79
Figura 31: A)	Diagrama esquemático do sistema de análise em fluxo otimizado para a determinação de organofosforado.....	84
Figura 31: B)	Reação dos organofosforados com o NBS em meio ácido na presença da rodamina B. ....	84
Figura 32:	Sequência das etapas de funcionalização dos NTC .....	88

Figura 33: Esquema da síntese das nanopartículas magnéticas.....	89
Figura 34: A) nanopartículas magnéticas em suspensão .....	89
Figura 34: B) nanopartículas magnéticas em repouso .....	89
Figura 34: C) nanopartículas magnéticas, sob a ação de um campo magnético externo .....	89
Figura 35: Síntese dos MNTC .....	90
Figura 36: A) Esquema da montagem empregando o manifold e em B) Esquema geral do recobrimento com BSA .....	91
Figura 36: B) Esquema geral do recobrimento com BSA.....	91
Figura 37: A) M-RACNT em suspensão .....	91
Figura 37: B) M-RACNT em repouso .....	91
Figura 37: C) M-RACNT sob a ação de um campo magnético externo.....	91
Figura 38: Procedimento proposto para a fase de extração dos organofosforados usando os M-RACNT .....	96
Figura 39: Varredura espectral do composto obtido a partir da reação com uma solução de 50 mg L <sup>-1</sup> de organofosforado.....	97
Figura 40: Reação entre a BSA imobilizada e o glutaraldeído formando bases de Schiff e, posteriormente, o intercruzamento de ligações .....	98
Figura 41: Micrografia eletrônica de Transmissão - (A) nanopartículas de ferro.....	99
Figura 41: Micrografia eletrônica de Transmissão - (B) M-CNTs .....	99
Figura 41: Micrografia eletrônica de Transmissão - (C) M-RACNTs.....	99
Figura 42: Exclusão de BSA. (A) BSA pura; (B) M-RACNTs e (C) M-CNTs.....	101
Figura 43: Esquema da exclusão de proteína da amostra .....	101
Figura 44: Representação do Diagrama de Pareto dos efeitos para os fatores estudados, a significância dos mesmos foi avaliada com erro padrão de 5%.....	103
Figura 45: Otimização Univariada para a solução de ácido acético e ácido clorídrico ( mol L <sup>-1</sup> ) .....	104
Figura 46: Curva de calibração analítica da mistura dos organofosforado clorpirifós, diazinon, malation, metamidofós e paratiom .....	105
Figura 47: Representação do Diagrama de Pareto dos efeitos para os cinco fatores estudados, a significância dos mesmos foi avaliada com erro padrão de 5%.....	106
Figura 48: A) Superfície de resposta referente a etapa de pré-concentração para a análise da mistura dos organofosforados na concentração de 100 µg L <sup>-1</sup> .....	108

Figura 48: B) Superfície de resposta referente a etapa de pré-concentração para a análise da mistura dos organofosforados na concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....	108
Figura 48: C) Superfície de resposta referente a etapa de pré-concentração para a análise da mistura dos organofosforados na concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....	109
Figura 49: Curva de calibração analítica da mistura dos organofosforado clorpirifós, malation, diazinon, metamidofós e paratiom na etapa de pré-concentração.....	112
Figura 50: A) Fiagrama em triplicata do branco, e berinjela fortificada com 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ da mistura dos organofosforados.....	115
Figura 50: B) Fiagrama em triplicata do branco, brócolis e brocolis fortificado com 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ da mistura dos organofosforados.....	115
Figura 50: C) Fiagrama em triplicata do branco, e couve-flor e couve-flor fortificada com 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ da mistura dos organofosforados .....	115
Figura 50: D) Fiagrama em triplicata do branco, leite de soja e leite de soja fortificado com 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ da mistura dos organofosforados .....	115
Figura 50: E) Fiagrama em triplicata do branco, vagem verde e vagem verde fortificada com 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ da mistura dos organofosforados .....	115
Figura 51: A) Cromatograma do branco, berinjela e berinjela fortificada com 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....	116
Figura 51: B) Cromatograma do branco, couve-flor e couve-flor fortificada com 30 $\mu\text{g L}^{-1}$	116
Figura 51: C) Cromatograma do branco, brócolis e brócolis fortificado com 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....	116
Figura 51: D) Cromatograma do branco, leite de soja e leite de soja fortificado com 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....	116
Figura 51: E) Cromatograma do branco, vagem verde e vagem verde fortificada com 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....	116

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AA</b>	Alça de Amostragem
<b>BSA</b>	Albumina bovina
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>C</b>	Confluência
<b>PCC</b>	Planejamento Composto Central
<b>CODEX</b>	Comitê do <i>Codex Alimentarius</i> de aditivos alimentares e contaminantes
<b>CG</b>	Cromatografia gasosa
<b>CCRUDF</b>	Comitê do <i>Codex Alimentarius</i> sobre resíduos e drogas veterinárias em alimentos
<b>CL</b>	Cromatografia líquido
<b>CAC</b>	Comissão de <i>Codex Alimentarius</i>
<b>CNTs</b>	Nanotubos de carbono
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquido de alta eficiência
<b>CENA-USP</b>	Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo
<b>CR<sub>1</sub></b>	Concentração do reagente 1
<b>CR<sub>2</sub></b>	Concentração do reagente 2
<b>CV</b>	Coefficiente de Variação
<b>DWCNTs</b>	<i>Double-walled carbono nanotubes</i>
<b>DDT</b>	Diclorodifeniltricloroetano
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>ET-ASS</b>	Espectrometria de absorção atômica eletrotérmica
<b>ELL - PBT</b>	Extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura
<b>EMBRAPA</b>	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<b>FIA</b>	Análise por injeção em fluxo, do inglês <i>Flow injection analysis</i>
<b>FL</b>	Frequência de Leitura
<b>FAO</b>	Organização para alimentação e agricultura das Nações Unidas.
<b>FDP</b>	Detecção fotométrica de chama
<b>GC-pyro-AFS</b>	Cromatografia gasosa acoplada a um detector de fluorescência atômica
<b>GF-AAS</b>	<i>Atomic Absorption Spectrometry with Graphite Furnace</i>
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>ICP-MS</b>	Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

<b>IN</b>	Instrução Normativa
<b>IBAMA</b>	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
<b>IUPAC</b>	<i>International Union Pure and Applied chemistry</i>
<b>Kg</b>	Quilograma
<b>K</b>	Constante
<b>LOD</b>	Limite de Detecção
<b>LOQ</b>	Limite de Quantificação
<b>LMR</b>	Limite máximo de resíduos
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
<b>mg</b>	Miligrama
<b>MERCOSUL</b>	Mercado Comum do Sul
<b>MSR</b>	Método de Superfície de resposta
<b>MWCNTs</b>	<i>Multi-valled Carbonnanotubes</i>
<b>M-RACNT</b>	Nanopartículas magnéticas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , revestidas com albumina bovina
<b>M/V</b>	Massa/Volume
<b>µg</b>	Micrograma
<b>ng</b>	Nanograma
<b>NBS</b>	N-Bromosuccinamida
<b>ODS</b>	Octadecil silano
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>OPs</b>	Organofosforados
<b>ONG</b>	Organização Não Governamental
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PARA</b>	Programa de análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos
<b>ppt</b>	Parte por trilhão
<b>PNCRC</b>	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes.
<b>PTFE</b>	Politetrafluoretileno
<b>RSD</b>	Desvio Padrão Relativo, do inglês: <i>Relative standard desviation</i>
<b>RSM</b>	Metodologia de Superfície de Resposta, do inglês <i>Methodology Response Surface</i>
<b>RFP</b>	Rifampicina
<b>RFX</b>	Rifaximina
<b>RAM</b>	Material de acesso restrito

<b>SAs</b>	Sulfonamidas
<b>Sbr</b>	Desvio padrão do branco
<b>SWCNT</b>	Wall Carbon Nanotubes
<b>TS-FF-AAS</b>	<i>Thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry</i>
<b>UNIFAL</b>	Universidade Federal de Alfenas – MG
<b>USP</b>	<i>United States Pharmacopeia</i>
<b>SPE</b>	Extração em fase sólida
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>TEM</b>	<i>Transmission eletronic microscopy</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i> - Organização Mundial da Saúde

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Sistema de Análise em Fluxo</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2</b>	<b>Quimiometria</b> .....	<b>25</b>
2.2.1	Planejamento Fatorial de Dois Níveis .....	25
2.2.2	Planejamento Matriz de Doehlert.....	26
<b>2.3</b>	<b>Nanotubos de Carbono (NTC)</b> .....	<b>27</b>
2.3.1	Funcionalização dos CNT.....	29
2.3.2	Nanotubos de carbono magnéticos.....	31
2.3.3	Nanotubos de carbono de acesso restrito.....	32
<b>2.4</b>	<b>Antibióticos</b> .....	<b>34</b>
2.4.1	Classificação dos antibióticos .....	34
2.4.2	Sulfonamidas (SAs).....	39
2.4.3	Métodos analíticos empregados para a determinação de sulfonamidas .....	42
<b>2.5</b>	<b>Pesticidas</b> .....	<b>44</b>
2.5.1	Métodos Analíticos Empregados para a Determinação de Organofosforados .....	50
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>53</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	<b>53</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>53</b>
<b>4</b>	<b>DETERMINAÇÃO DE SULFAGUANIDINA SÓDICA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS</b> .....	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>Metodologia Experimental</b> .....	<b>55</b>
<b>4.2</b>	<b>Instrumentação</b> .....	<b>55</b>
<b>4.3</b>	<b>Reagentes e Soluções</b> .....	<b>56</b>
<b>4.4</b>	<b>Preparo das Amostras</b> .....	<b>57</b>
4.4.1	Formulações farmacêuticas sólidas, semissólidas e amostras de leite, ovo e fígado de frango .....	57
<b>4.5</b>	<b>Determinação de Sulfaguanidina Sódica em Sistema FIA</b> .....	<b>59</b>
4.5.1	Procedimentos de otimização.....	61
4.5.1.1	Otimização das condições experimentais .....	61
4.5.1.2	Planejamento Matriz de Doehlert.....	64
<b>4.6</b>	<b>Figuras de Mérito</b> .....	<b>65</b>
4.6.1	Faixa de resposta e linearidade .....	65
4.6.2	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) .....	66
4.6.3	Frequência de Leitura (FL) .....	66

<b>4.7</b>	<b>Estudos de Interferentes.....</b>	<b>66</b>
<b>4.8</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>68</b>
4.8.1	Estudos Preliminares .....	69
4.8.2	Otimização multivariada do método on-line desenvolvido .....	69
4.8.3	Planejamento Matriz de Doehlert para a determinação de Sulfaguanidina Sódica.....	72
4.8.4	Efeito da Alça de Amostragem e do Reator R <sub>2</sub> sobre o Sinal Analítico .....	74
4.8.5	Análise Multivariada de Interferentes no Sistema FIA .....	76
4.8.6	Figuras de Mérito e Aplicação em Amostras.....	79
<b>4.9</b>	<b>Considerações finais .....</b>	<b>81</b>
<b>5</b>	<b>SISTEMA DE ANÁLISE EM FLUXO PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE ORGANOFOSFORADOS EM ALIMENTOS, USANDO PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM MATERIAL DE ACESSO RESTRITO COMPOSTO DE NANOTUBO DE CARBONO MAGNÉTICO REVESTIDO COM ALBUMINA BOVINA (M-RACNT) .....</b>	<b>82</b>
<b>5.1</b>	<b>Metodologia Experimental .....</b>	<b>82</b>
<b>5.2</b>	<b>Reagentes e Soluções .....</b>	<b>82</b>
<b>5.3</b>	<b>Determinação On-line de Organofosforados em Amostras Alimentícias.....</b>	<b>83</b>
<b>5.4</b>	<b>Procedimentos de Otimização do Sistema FIA para a Determinação de Organofosforados.....</b>	<b>85</b>
5.4.1	Otimização do sistema FIA para detecção espectrofotométrica de organofosforados	85
5.4.2	Otimização Univariada .....	86
5.4.3	Cromatografia Líquido de alta eficiência .....	87
<b>5.5</b>	<b>Nanotubos de Carbono.....</b>	<b>87</b>
5.5.1	Funcionalização dos nanotubos de carbono (NTC) .....	87
5.5.2	Síntese das nanopartículas magnéticas .....	88
5.5.3	Síntese dos nanotubos de carbono magnéticos (MCNT).....	89
5.5.4	Revestimento dos MCNTs com albumina bovina (BSA).....	90
<b>5.6</b>	<b>Otimização do Sistema de Pré-Concentração Magnética Dispersiva Usando os M-RACNTs .....</b>	<b>92</b>
5.6.1	Planejamento Fatorial de Dois Níveis 2 <sup>5-2</sup> para a etapa de pré-concentração dos organofosforados com os M-RACNTs.....	92
5.6.2	Planejamento Matriz de Doehlert.....	93
<b>5.7</b>	<b>Preparo do Branco e das Amostras .....</b>	<b>94</b>
5.7.1	Preparo do branco.....	95
5.7.2	Sistema de extração magnética usando M-RACNTs em amostras de alimentos .....	95
<b>5.8</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>96</b>
5.8.1	Varredura Espectral dos Organofosforados .....	97
5.8.2	Recobrimento dos MCNT Com BSA bovina .....	97
<b>5.9</b>	<b>Caracterização dos M-RACNTs .....</b>	<b>99</b>

5.9.1	Micrografia Eletrônica de Transmissão.....	99
5.9.2	Capacidade de Exclusão .....	100
<b>5.10</b>	<b>Otimização do Sistema de Análise em Fluxo .....</b>	<b>102</b>
5.10.1	Planejamento fatorial de dois níveis ( $2^{6-2}$ ) na otimização das variáveis do sistema FIA .....	102
5.10.2	Efeito da concentração do ácido acético/ácido clorídrico sobre o sinal analítico.....	103
<b>5.11</b>	<b>Figuras de Mérito .....</b>	<b>105</b>
<b>5.12</b>	<b>Planejamento Fatorial de Dois Níveis <math>2^{5-2}</math> para a Otimização da Etapa de Pré-Concentração com os M-RACNT.....</b>	<b>106</b>
<b>5.12.1</b>	<b>Planejamento Matriz de Doehlert.....</b>	<b>107</b>
<b>5.13</b>	<b>FIGURAS DE MÉRITO .....</b>	<b>111</b>
5.13.1	Faixa de resposta linear na etapa de pré-concentração.....	111
<b>5.14</b>	<b>Características Analíticas.....</b>	<b>113</b>
<b>5.15</b>	<b>Validação do Método On-line e Aplicação em Amostras Alimentícias .....</b>	<b>114</b>
<b>5.16</b>	<b>Considerações finais .....</b>	<b>117</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>118</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>119</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A atividade agropecuária brasileira pertence ao setor primário da economia, sendo umas das primeiras atividades econômicas desenvolvidas no Brasil, apresentando um papel importante para o cenário nacional, além de contribuir de forma significativa para o comércio exterior (FREITAS, 2017).

O Brasil, desde 2010, é o terceiro maior produtor e exportador agropecuário do mundo, atrás, apenas, dos Estados Unidos e da União Europeia, e, segundo perspectivas, tenderá a crescer nos próximos anos (CHADE, 2019).

O rebanho bovino brasileiro é o segundo maior do mundo, com mais de 200 milhões de cabeças de gado, sendo assim, faz do Brasil o maior exportador mundial de carne, além disso, possui uma elevada produção de leite para o consumo no mercado interno (SMERALD I; MAY, 2008).

Atualmente, o Brasil deixou de ser um país importador de alimentos, transformando-se em um grande exportador de produtos agropecuários. Entre os anos de 1975 e 2015, o fator médio de crescimento da produção agropecuária foi de 3,58% ao ano, atingindo, na última década, um aumento de 4,08% (FREITAS, 2017). Com a elevada produção agropecuária, ocorreu um grande consumo de pesticidas e medicamentos veterinários, que levou o Brasil, na última década, a ser o maior consumidor mundial nesses segmentos. Dessa forma, para a produção de alimentos e animais destinados ao abate, é constante o uso de medicamentos veterinários com ações preventivas e terapêuticas (LONDRES, 2011). Entretanto, o uso indiscriminado desses compostos, compromete a saúde, visto que os resíduos desses produtos podem ser consumidos na dieta, estando presentes nos vegetais, carnes, ovos e leite (BRASIL, 2012).

Com a finalidade de assegurar a qualidade dos produtos de origem animal e vegetal, a Organização Mundial de Saúde (OMS) vem trabalhando intensamente para estabelecer e controlar os limites de resíduos de medicamentos veterinários e pesticidas em alimentos. Em conjunto com a OMS, a Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (do inglês, *Food and Agriculture Organization - FAO*) criaram a Secretaria da Comissão do *Codex Alimentarius* (CAC) (BOTSOGLOU; FLETOURIS, 2001). Esses órgãos, regulamentadores, estabeleceram para alimentos como carnes, ovos e leite, o limite máximo de resíduos de sulfas de  $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$  e para pesticidas organofosforados, os valores estão

definidos entre 10  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  até 100  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ . Essa variação está relacionada com a classe de pesticida e com o tipo de dieta usada na alimentação.

No ano de 2009, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2009) publicou, no Diário Oficial da União, a Instrução Normativa Nº 26, que trata de um “Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos de uso veterinário”. De acordo com esse regulamento, nenhum medicamento veterinário, destinado a animais de abate, poderá ser comercializado sem os testes dos estudos de eficácia, segurança e determinação do período de carência. Essas informações devem estar disponíveis nas embalagens dos produtos.

Os resíduos de medicamentos veterinários, de origem animal, podem ocorrer a partir do não cumprimento do período de carência para o abate ou através de rações de origem vegetal, seja pela aplicação de pesticidas em áreas de produção animal (currais, granjas e estábulos) ou através do uso excessivo desses produtos, podendo, assim, afetar a segurança alimentar (BLOMBERG, 2009; SHI, 2015).

A presença de resíduos de antibióticos e pesticidas em alimentos pode causar efeitos deletérios à saúde humana, por serem mutagênicos, cancerígenos, citotóxicos, genotóxicos, teratogênicos e imunotóxicos (WILLIAMS; JAMES; ROBERTS, 2014). Dessa forma, monitorar a quantidade desses compostos é de suma importância para garantir a segurança alimentar nos diversos tipos de produtos que fazem parte da dieta básica do brasileiro (BRASIL, 2012).

Nesse contexto, métodos analíticos para a determinação de antibióticos e pesticidas têm sido aprimorados e a literatura reporta diferentes técnicas, como: espectrofluorimetria (PENA *et al.*, 1992), métodos eletroanalíticos (MASAGATI, 2002), eletroforese capilar (SHAKULASHVILI, 2004; MARDONES; RIOS; VARCÁREL, 2006), biossensores eletroquímicos (FURTADO *et al.*, 2008), cromatografia gasosa (UEYAMA *et al.*, 2006; BIAN *et al.*, 2018), técnicas de extração em fase sólida, utilizando materiais RAM (*restricted-access material*) (CUI *et al.*, 2015), determinações por espectrofotometria (RAGHUVVEER *et al.*, 1993, ERRAYESS *et al.*, 2017), cromatografia líquido equipadas com técnicas de detecção simples, como ultravioleta (UV) ou acoplados com sofisticados espectrômetros de massas (MALDANER; SANTANA; JARDIM, 2008; GADJA *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019), polímero molecular impresso (MIP) - Cromatografia em camada delgada (MUTAVDZIC *et al.*, 2014), QueEchERS – UPLC -MS/MS (XU *et al.*, 2019) e outras técnicas analíticas.

Visando contribuir com as questões supracitadas, o presente estudo traz a aplicação dos sistemas de análise em fluxo e extração em fase sólida, com vistas à determinação de resíduos de antibióticos (Sulfaguanidina sódica) em amostras farmacêuticas e de alimentos e pesticidas (organofosforados), bem como em amostras alimentícias (vegetais).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão bibliográfica relata uma sinopse sobre os sistemas por análise em fluxo, planejamento e otimização de experimentos, antibióticos, organofosforados, nanotubos de carbono (CNTs) e materiais de acesso restritos (RAM).

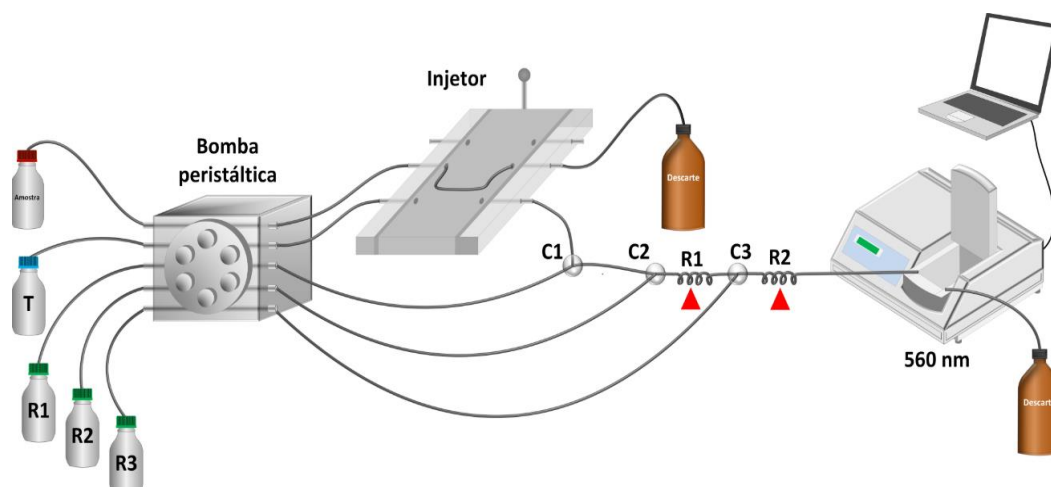
### 2.1 Sistema de Análise em Fluxo

Os sistemas de análise por injeção em fluxo (do inglês *flow injection analysis*, FIA) foi desenvolvido no ano de 1957, por Skeggs (SKEGGS, 1957), revisitado por Ruzicka e Hansen, em 1975, (RUZICKA; HANSEN, 1975) sendo introduzido, no Brasil, em 1976, por pesquisadores do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) (RUZICKA; STEWART; ZAGATTO, 1976; BERGAMIN; REIS; ZAGATTO, 1978; MICRONAL, 1984).

A partir de 1977, ocorreu um desenvolvimento rápido dos sistemas FIA em muitos países, com consequente expansão dos novos conceitos envolvidos, o que culminou no aparecimento dos primeiros analisadores FIA comercialmente disponíveis na Suécia e Estados Unidos (REIS; GINÉ; KRONKA, 1996).

Nessa modalidade analítica, a amostra é inserida no sistema através de um fluxo carregador, que a transporta até um detector acoplado ao sistema em fluxo. Ao longo do percurso analítico, a amostra pode sofrer tratamento em linha, como: a adição de reagentes por confluência, adaptação de colunas para a pré-concentração ou contendo reagentes em fase sólidas (REIS; GINÉ; KRONKA, 1996). Normalmente, os sistemas por análise em fluxo são divididos em quatro partes, sendo a primeira a propulsão dos fluídos, geralmente, por uma bomba peristáltica. Na segunda etapa, ocorre a inserção da amostra através de um injetor comutador. Na terceira etapa, no percurso analítico, são adicionados reagentes por confluências e para melhorar a interação amostra e reagente são acopladas bobinas de reação. Por último, tem-se um sistema de detecção, conforme mostrado no esquema da Figura 1.

Figura 1: Sistema de análise em fluxo por confluência, R1, R2 e R3 reagentes; T solução transportadora; C1, C2 e C3 confluências para adição de reagentes; R1 e R2, bobinas reacionais



Fonte: O autor (2017)

Os sistemas FIA foram propostos como um método alternativo aos procedimentos convencionais, diminuindo o manuseio das amostras, bem como a quantidade dos reagentes utilizados (BURGUERA, 1989), visando à determinação quantitativa de espécies químicas. Sua aplicação tem características favoráveis quando: a) o número de amostras for grande, b) para minimizar o consumo de amostras e reagentes, c) aumentar a frequência analítica, d) melhorar a precisão dos resultados analíticos, e) redução de custos operacionais e f) geração de menor volume de resíduos (LIMA *et al.*, 2010).

Devido a sua ampla gama de aplicações práticas e a simplicidade instrumental, nas últimas décadas essa modalidade analítica despertou grande interesse na comunidade internacional, refletindo, assim, em um grande número de publicações (21st International Conference on Flow Injection Analysis and Related Techniques, 2017). Dentre as principais vantagens dessa modalidade, tem-se a versatilidade, o baixo custo, a fácil operação e a ampla aplicação da espectrofotometria molecular, sendo assim possível a obtenção de métodos com desempenhos melhorados. Quando a finalidade para o método for reduzir o consumo de reagentes, os sistemas de zonas coalescentes e fluxo intermitente são bem empregados. Na primeira configuração, alíquotas predefinidas de reagentes e amostras são inseridas simultaneamente no percurso analítico, evitando, assim, o consumo em excesso de ambos. Na configuração com fluxo intermitente, a introdução do reagente ocorre somente na etapa de amostragem, contribuindo para a economia do mesmo e reduzindo o volume de resíduos

(REIS; GINÉ; KRONKA, 1996; ARMENTA; GARRIDES; GUARDIA, 2008; KOLEV; MCKELVIE, 2008).

A maioria dos trabalhos reportados empregando sistemas FIA, tem utilizado a otimização monovariada convencional. Trabalhos recentes têm apontado para uma expressiva vantagem do uso de ferramentas quimiométricas para esse fim. Assim, o item seguinte apresenta uma abordagem dessa ferramenta, a qual também foi utilizada no presente trabalho.

## 2.2 Quimiometria

Quando se pretende desenvolver um novo procedimento de análise, os fatores que influenciam no método analítico, como concentração de reagentes, temperatura, tempo de agitação, tipos de solventes, pH e entre outros, devem ser otimizados, objetivando a melhoria na resposta analítica. Uma das formas de estudar e de otimizar esses fatores é fazer uso da tradicional otimização univariada. Nesse tipo de otimização, cada fator é avaliado isoladamente, fixando-se os demais. Apesar da otimização univariada ainda ser muito utilizada, ela apresenta, como desvantagem, um elevado número de experimentos, tornando, assim, o processo de otimização moroso, além de não se obter informações a respeito das interações entre os fatores sobre a resposta analítica (FERREIRA *et al.*, 2003).

Para sanar essa limitação, a otimização multivariada vem ganhando destaque como um método alternativo, visto que permite otimizar todos os fatores de forma simultânea, garantindo maior eficiência, menor número de ensaios e, ainda, permite explorar a informação da interação entre fatores que podem contribuir para a resposta analítica (HIBBERT, 2012). Assim, os itens seguintes apresentam uma síntese dos planejamentos utilizados nos estudos de otimização e aplicados neste trabalho.

### 2.2.1 Planejamento Fatorial de Dois Níveis

Os planejamentos fatoriais de dois níveis são usados como o primeiro passo para se otimizar um sistema analítico. Com o uso desses planejamentos, faz-se uma triagem, a fim de verificar quais são os fatores (variáveis) que apresentam efeitos significativos no método

analítico. De acordo com Neves e Schwartzman (2002), esse tipo de planejamento normalmente é representado por  $2^k$ , sendo  $k$  o número de fatores. Com as combinações dos  $k$  fatores investigados em dois níveis, tem-se um planejamento composto de  $2^k$  experimentos. De modo geral, os planejamentos fatoriais do tipo  $2^k$  são os mais comuns, apesar de ser possível fazer uso de meias frações, os chamados planejamentos fatoriais fracionários descritos como  $2^{k-n}$ , em que  $n$  pode ser igual a 1, 2, 3, ... $n$ .

Com os resultados obtidos nos experimentos do planejamento fatorial de dois níveis, calcula-se o efeito que cada fator exerce sobre o sistema e, assim, verifica-se quais são significativos.

Após a avaliação da significância dos fatores, a otimização em si de um método analítico é realizada por meio do uso de modelos matemáticos quadráticos, podendo ser construído a partir da matriz de *Doehlert*, Planejamento Composto Central (CCD) ou planejamento *Box-Behnken* (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005). No presente trabalho foi empregada a Matriz de *Doehlert* na etapa de otimização.

### 2.2.2 Planejamento Matriz de *Doehlert*

O modelo de otimização por Matriz de *Doehlert* é um planejamento uniforme, proposto por *Doehlert* em 1970 e tem sido usado em química analítica (DOEHLERT, 1970). Tem uma estrutura propícia para a aplicação do Método de Superfície de Resposta (MSR), permitindo a estimativa dos parâmetros de um modelo quadrático e a construção de planejamentos sequenciais.

Essa técnica se baseia em matrizes experimentais, que apresentam pelo menos três níveis para cada variável. Inclui procedimentos estatísticos na modelagem matemática de respostas, permitindo estudar, modelar e deslocar o sistema até a sua otimização (FERREIRA; BEZERRA; SANTOS, 2003; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

O planejamento Matriz de *Doehlert*, apresenta como vantagem a possibilidade de estudar os fatores mais importantes com números maiores de níveis. Como exemplo, uma matriz de *Doehlert* para três fatores apresenta os seguintes níveis 3, 5 e 7. Dessa forma, o fator mais significativo pode ser estudado em uma faixa mais extensa de níveis, a saber, 7 níveis, garantindo, assim, uma otimização mais eficiente (TEÓFILO; FERREIRA, 2006). A resposta obtida dos experimentos, possibilita a construção de uma função polinomial que pode ser

perfeitamente empregada na construção das superfícies de resposta. Para obter as condições de ótimo, a partir dessas funções, basta derivar a equação obtida do planejamento em função do fator de interesse e igualá-la a zero (LUNDSTEDT *et al.*, 1998). Neste trabalho o Planejamento Matriz de Doehlert, foi aplicado para a otimização dos métodos por análise em fluxo e para a extração em fase sólida utilizando material de acesso restrito.

### 2.3 Nanotubos de Carbono (NTC)

Os primeiros trabalhos sobre nanotubos de carbono datam de 1991, quando Iijima almejava produzir fulerenos pela técnica de descarga de arco. Nessa síntese, foram observadas estruturas formadas por múltiplas camadas de folha de grafeno, com diâmetros na ordem de nanômetros e comprimentos superiores a 1 $\mu$ m. Dessa forma, o mundo passou a saber que o carbono podia apresentar outras configurações muito importantes (IJIMA, 1991).

Desde a sua descoberta, os nanotubos de carbono têm sido empregados, como substratos de sorção em extrações em fase sólida, para a pré-concentração de analitos em amostras orgânicas e inorgânicas, a partir de diferentes matrizes (LATORRE *et al.*, 2012; MANI; CHEN; LOU, 2013; TIWARI *et al.*, 2016).

Dentre as suas propriedades favoráveis, podemos citar: grande resistência térmica, são bastante flexíveis, não quebram ou sofrem avarias quando dobrados ou quando são submetidas à alta pressão, elevada estabilidade química e física, grande área superficial, alta rugosidade, boa resistência ao cisalhamento, além de apresentar propriedades interlaminares, características que garantem que sejam usados como sorventes em etapas de pré-concentração (ALEKSANDER, 2007; YAKOBSON; AVOURIS, 2001; CUI; ZHENG, XIN, 2015; WANG *et al.*, 2018).

São vários os campos de aplicação dos NTC's, como: na química, na farmácia, na biotecnologia, na eletrônica, na ótica, produções de medicamentos, na dessalinização da água, em nanotermômetros, além de outras aplicações (GAO; BANDO, 2002; HOLT *et al.*, 2004; NIU; MENG, LU, 2013; POUDEL, LI, 2018). Em decorrência da sua elevada estabilidade química e física e pela grande área superficial, podem ser aplicados em processos adsortivos de extração em fase sólida (CHENG; WANG; JIANG, 2008; JI *et al.*, 2017; HASE *et al.*, 2017).

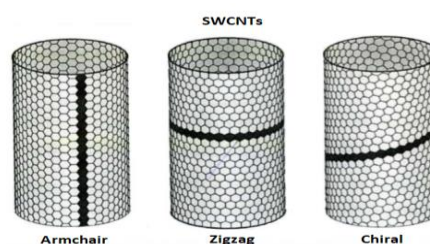
Esses materiais podem ser classificados, de acordo com a configuração, em nanotubos de carbono de camada simples (do inglês *Single-Walled Carbon Nanotubes SWCNTs*), nanotubos de carbono de camada dupla (*DWCNTs – Double-Walled Carbon Nanotubes*) ou nanotubos de carbono de camadas múltiplas (*MWCNTs – Multi-Walled Carbon Nanotubes*) (BELIN, 2005; ZARBIN, 2007; HERRERO-LATORRE; BARCIELA, 2017).

Os nanotubos de parede simples (Figura 2A) podem ser visualizados como uma folha de grafeno enrolada. Eles podem ser classificados como: “zigzag”, “armchair” e “chiral” (Figura 2B). Essa classificação depende da orientação da folha do grafeno em relação ao eixo do tubo (chiralidade). Tal chiralidade é importante para as propriedades eletrônicas dos CNTs (IJIMA, 1991).

Figura 2: A) Esquema de um nanotubo de carbono de parede simples. B) Diferentes tipos de nanotubo de carbono



Fonte: Adaptado de Zarbin (2007)



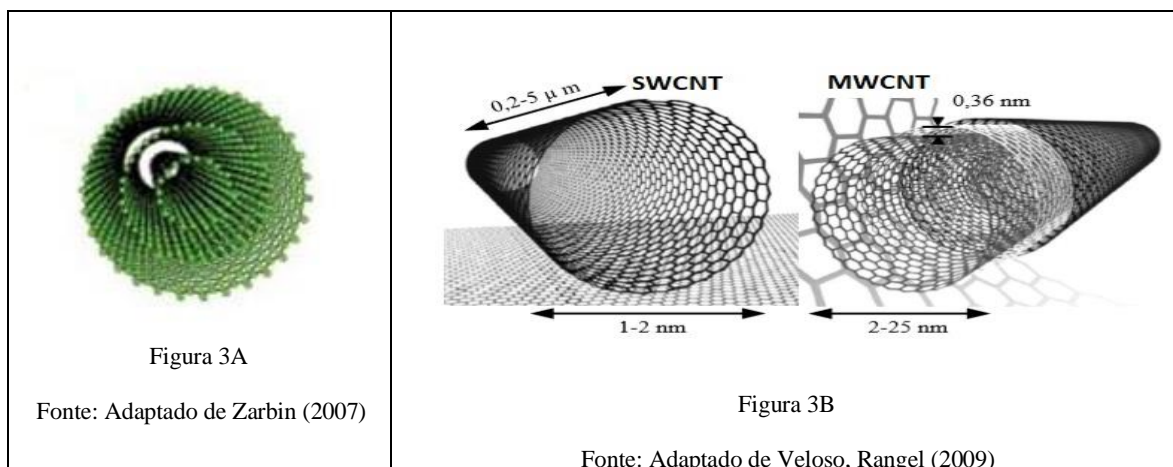
Fonte: Adaptado de Sanpaio (2009)

Esses materiais apresentam diâmetros na ordem de 4-10 nanômetros. Na literatura é possível encontrar relatos de nanotubos, com 25 nm de diâmetro (ZARBINI, 2007). O comprimento desses nanotubos variam desde nanômetros até microns (Figura 3A).

Em função do alto peso molecular e sua grande flexibilidade, os nanotubos de parede simples tendem a formar emaranhados devido às forças de *Van Der-Waals* (IJIMA; ICHIHASHI, 1993), que são geralmente encontrados de forma agregadas.

Os nanotubos de parede múltipla (*MWCNTs*) consistem em muitos nanotubos de parede simples, arranjados de forma concêntrica (Figura 3B). Os números de paredes podem variar de duas a dezenas. O espaçamento entre cada parede é de 0,334 nm (Figura 3B). Em função das múltiplas paredes, esses nanotubos são mais rígidos que os nanotubos de paredes simples.

Figura 3: A) Esquema de um nanotubo de carbono de paredes múltiplas. B) Ilustração de nanotubo de carbono de parede simples (SWCNT) e de paredes múltiplas (MWCNT), com diferentes tamanhos nas larguras e comprimentos



### 2.3.1 Funcionalização dos CNT

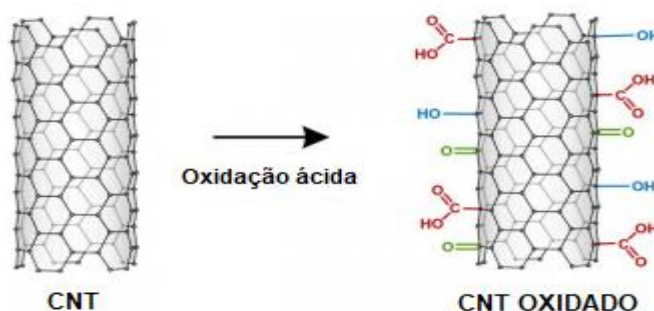
NTC's podem ter suas características aprimoradas por meio da funcionalização, visto que a mesma incorpora grupamentos químicos à superfície do material, contribuindo para aumentar a adsorção de compostos inorgânicos/orgânicos. Além disso, o processo de funcionalização pode favorecer a interação interfacial, bem como sua estabilidade de dispersão e miscibilidade dos NTCs com a amostra (KIM *et al.*, 2012; WANG; CAI, 2014).

O processo de funcionalização pode ser covalente (química) e não covalente (física). No caso da funcionalização covalente, envolve ligações químicas entre os NTCs e os grupos funcionais e/ou amostras. As modificações de superfície do tipo covalente ocorrem tanto nas paredes quanto nas terminações dos NTC's. Enquanto a funcionalização não covalente, envolve basicamente interações fracas, tais como ligações de Van der Waals, interações hidrofóbicas e interações  $\pi$ - $\pi$ , entre os NTCs e a amostra (KIM *et al.*, 2012).

As funcionalizações dos CNTs têm sido vistas como uma forma de explorar seu potencial na nanotecnologia. Os nanotubos funcionalizados apresentam propriedades eletrônicas e mecânicas, que são substancialmente superiores aos dos nanotubos não funcionalizados (TOÇOGLU *et al.*, 2016). Essas estruturas, quimicamente modificadas podem ser usadas de forma a facilitar a interação dos nanotubos com moléculas orgânicas, inorgânicas e biológicas (HUANG *et al.*, 2005; CHATTERJEE; YANG *et al.*, 2017) ou com outros grupos químicos, como fármacos e, até mesmo, com vírus e bactérias (SRIVASTAVA

*et al.*, 2013; ZHOU; CHEN; DIAO, 2013; ZHU *et al.*, 2016) tornando-os também sensores capazes de detectar pequenos traços da espécie alvo e com alta seletividade. A Figura 4 apresenta a funcionalização dos NTCs por ataque ácido.

Figura 4: Esquema da funcionalização ácida na superfície dos CNTs

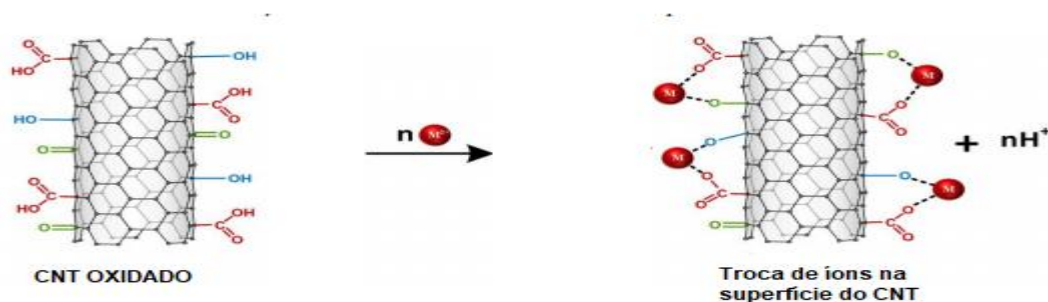


Fonte: Adaptado de Gupta *et al.* (2016)

As modificações covalentes nas superfícies dos CNTs (Figura 4), podem ser realizadas pelo uso de agentes oxidantes, como  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NaOCl}$ ,  $\text{KMnO}_4$ , promovendo defeitos na estrutura desses materiais. Os processos de oxidação induzem a abertura das extremidades e a formação de buracos nas paredes laterais dos CNTs e, como produto final, obtêm-se fragmentos de comprimento menor, cujas extremidades e paredes laterais apresentam grupos funcionais oxigenados, principalmente, carbonilas ( $\text{C}=\text{O}$ ), ácidos carboxílicos ( $\text{HO}-\text{C}=\text{O}$ ) e hidroxilas ( $\text{C}-\text{OH}$ ) (ROSARIO-CASTRO *et al.*, 2009).

Em amostras contendo metais, os grupos estabelecidos na superfície dos CNTs são responsáveis pelo aumento na carga negativa do material, sendo os átomos de oxigênio doadores de par de elétrons livres para os íons metálicos (amostra) (Figura 5), aumentando a sua capacidade de troca catiônica. A eficácia de adsorção de íons metálicos (amostra) nos CNTs depende fortemente da acidez superficial dos CNTs funcionalizados (RAO; LU; SU, 2007). Essa troca de prótons, entre os grupos funcionais da superfície dos CNTs e os íons metálicos (amostra), pode ser explicada pelas interações químicas entre ambos. Têm-se como principais mecanismos de adsorção dos íons metálicos sobre CNT, a atração eletrostática e a interação química entre os íons do metal (ZHANG; QING, 2003).

Figura 5: Esquema do mecanismo de sorção de íons metálicos divalentes na superfície dos CNTs



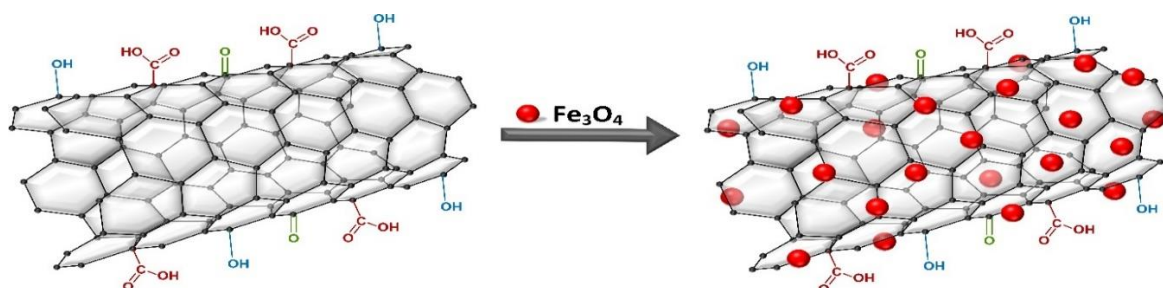
Fonte: Adaptado de Rosario-Castro *et al.* (2009)

### 2.3.2 Nanotubos de carbono magnéticos

O uso de partículas magnéticas para a extração de analitos teve início em 1987, utilizando partículas de ferro em procedimentos de extração líquido-líquido. Somente em 1999 foi introduzida a extração em fase sólida, usando partículas magnéticas. A magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) contém ambos os átomos de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , sendo um material ferrimagnético, ou seja, é um óxido e apresenta propriedades magnéticas (CORNELL; SCHWERTMANN, 1996; CORNELL, 2003)

É possível sintetizar um material híbrido (Figura 6), unindo a elevada capacidade adsortiva dos CNTs e o paramagnetismo das partículas magnéticas (LI; CHEN; YAN-PING, 2015; DENG *et al.*, 2014; ALBAAJI *et al.*, 2016). Com essa técnica, o analito pode ser separado da amostra pelo uso de um campo magnético externo, ímã. Em seguida, o material é removido das nanopartículas, com um eluente específico, sem afetar a capacidade adsortiva dos CNTs (CHEN *et al.* 2012; WANG; WANG; WAN, 2012; GIAKISIKLI; ANTHEMIDIS, 2013; LI; CHEN; YAN-PING, 2015).

Figura 6: Representação esquemática da formação de compósito híbridos a base de nanotubos de carbono funcionalizados e nanopartículas magnéticas

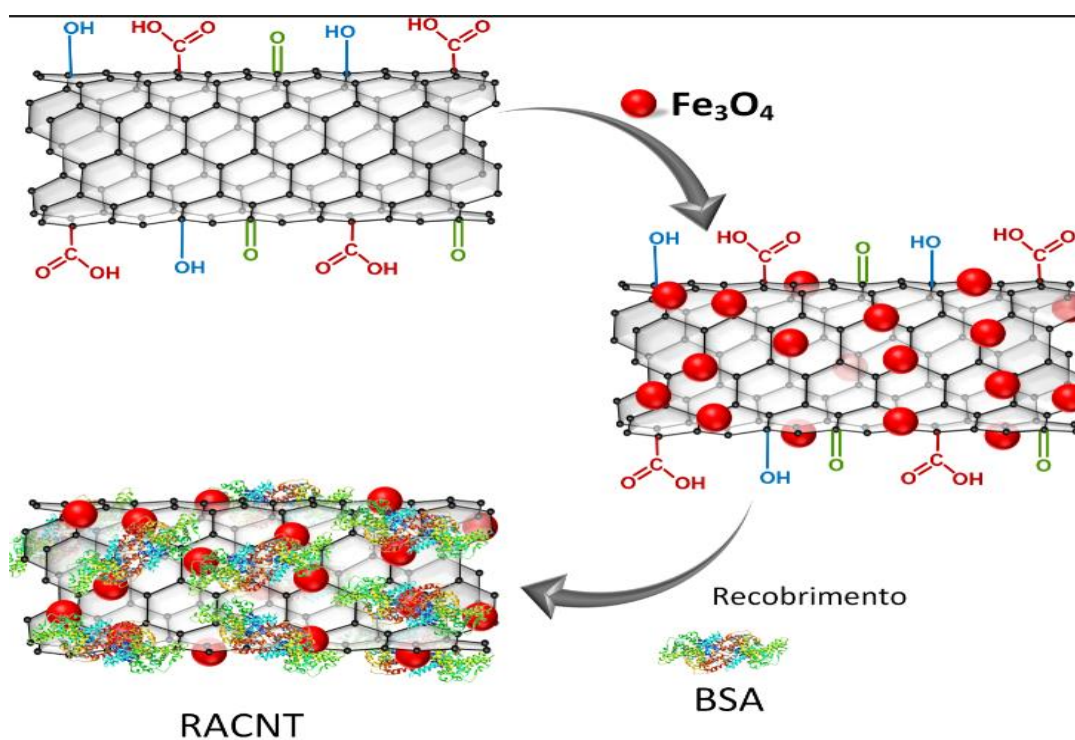


Fonte: Adaptado de Li, Chen e Yan-Ping (2015)

### 2.3.3 Nanotubos de carbono de acesso restrito

Materiais de acesso restrito (*restrict access material* (RAM)) foram desenvolvidos nas últimas duas décadas, sendo usados, principalmente, para a extração de substâncias com baixo peso molecular em matrizes complexas, contendo macromoléculas (mais frequentemente proteínas). Esses materiais propiciam a separação (não adsorção) de proteínas, por meio de mecanismos físicos e químicos (SOVERAIN; RUDAZ; VEUTHEY, 2004). A Figura 07 mostra o M-RACNT desenvolvido neste trabalho.

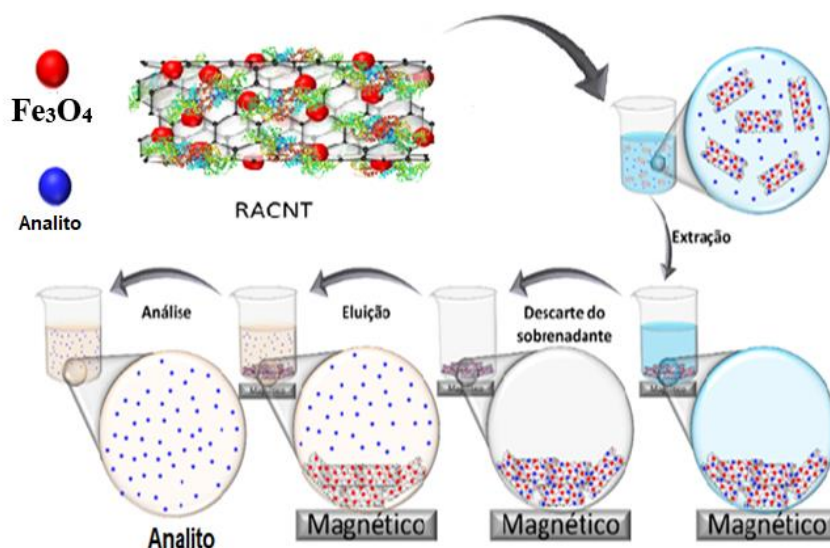
Figura 7: Nanotubo de carbono funcionalizado (NTC), posteriormente com as nanopartículas magnéticas e com o recobrimento pela BSA (M-RACNT)



Fonte: O autor (2017)

A Figura 8 mostra a extração em fase sólida, usando M-RACNTs magnéticos, que são colocados em solução contendo o analito. Através de um processo de agitação, o analito é extraído por adsorção na superfície no M-RACNTs, que é posteriormente separado da solução por meio de um campo magnético (ímã).

Figura 8: Esquema de extração em fase sólida usando M-RACNTs magnéticos



Fonte: O autor (2018)

Dentro desse contexto, o primeiro trabalho relatado na literatura, sobre a aplicação RA-CNTs, foi para a extração de íons cádmio em amostras de soro sanguíneo humano (BARBOSA *et al.*, 2015). Um sistema de análise em fluxo foi utilizado, no qual cádmio foi extraído de amostra de plasma e, sequencialmente, eluído e detectado por espectrometria de absorção atômica em chama com atomização por spray térmico (*Thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry* (TS-FF-AAS)).

Pela primeira vez foi possível analisar íons metálicos por TS-FF-AAS em amostras de soro sanguíneo sem tratamento prévio. Um teste de exclusão proteica realizada pelos autores atestou que o material foi capaz de excluir 100% da proteína. As partículas desenvolvidas demonstraram uma elevada capacidade para extrair cádmio de matrizes biológicas, evitando os procedimentos convencionais de preparação das amostras. Essa metodologia apresentou baixo limite de quantificação, elevada precisão e exatidão.

No presente trabalho, propõe-se a síntese de material de acesso restrito magnético, unindo, assim, as propriedades adsorptivas dos NTCs ao rápido processo de separação do analito da matriz, conferido pela incorporação de nanopartículas magnéticas sobre o material. Além disso, o revestimento com uma camada de BSA permitirá que o material seja usado para a extração de analitos em matrizes com alto teor proteico.

## 2.4 Antibióticos

Ao longo da evolução da humanidade, são vários os relatos de tentativas do uso de substâncias com o intuito de tratar lesões, curar febres e inibir dores de forma geral (LIVERMORE; WILLIAMS, 1996). Os antibióticos são substâncias desenvolvidas a partir de fungos, bactérias ou materiais sintéticos, com a finalidade de combater microrganismos causadores de infecções (CHAMBERS; SANDE, 1996).

A descoberta dos antibióticos, na década de 1920, por Alexander Fleming (1881 – 1955) (PEREIRA; PITA, 2005) é considerada uma das principais conquistas da humanidade, pois além de aumentar significativamente a expectativa de vida, contribuiu para a medicina moderna como precursor para a descoberta de novos fármacos (ALVAN; EDLUND; HEDDINI, 2011; CARLET, 2011; BUTLER; BLASKOVICH; COOPER, 2013). Nos anos seguintes à descoberta dos antibióticos, principalmente nas décadas de 40 a 70, ocorreu um grande aumento na produção e disponibilização de novos medicamentos no mercado. No entanto, nos últimos 30 anos, a produção de antibióticos sofreu uma queda em razão desses novos fármacos apresentarem menos eficiência ao combate e controle de microrganismos (COATES *et al.*, 2002).

Quando os primeiros medicamentos começaram a ser comercializados, tinha-se a ideia de que as doenças infecciosas estariam controladas (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988; BARRETT, 2005). Entretanto, o uso excessivo desses compostos contribuiu para a proliferação de cepas e bactérias resistentes, tanto na medicina humana quanto veterinária (HOGBERG; HEDDINI; CARS, 2010; WALSH; TIMOTHY, 2013). Hoje, sabe-se que o uso indiscriminado de antibióticos contribui para o surgimento de bactérias que se adaptam às mudanças em seu ambiente e desenvolvem mecanismos de resistência que inativam ou limitam a efetividade desses antibióticos.

### 2.4.1 Classificação dos antibióticos

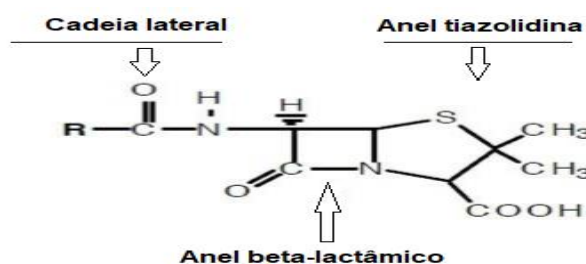
Os antibióticos podem ser classificados quanto: à estrutura química do composto, à via biossintética na qual o composto interfere (mecanismo de ação) e ao seu espectro de ação e alvo (ALMEIDA, 2005).

A classificação dos antibióticos baseada na sua estrutura química, leva em conta grupamentos químicos periféricos, que conferem propriedades farmacológicas específicas e

espectro de atividade ao antibiótico (FISCHBACH; WALSH, 2009). Os principais grupos de antibióticos disponíveis no mercado são: penicilinas, glicopeptídeos, aminoglicosídeos, rifamicinas e sulfonamidas (SAs).

A penicilina é um dos antibióticos mais utilizados na pecuária brasileira, sendo produzida através do fungo *Penicillium chrysogenum*. Durante a sua produção, quando adicionados determinados precursores ao meio de cultura, são produzidas estruturas de antibióticos diferentes (TATSUMURA, 2015). Por exemplo, para a produção da penicilina G ou denominada Benzilpenicilina, é feita a adição do ácido fenilacético. Se for adicionado o ácido fenoxiacético, o produto obtido é a penicilina V ou fenoximetilpenicilina (WRIGHT, 1999). A Figura 9 mostra a estrutura geral das penicilinas.

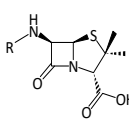
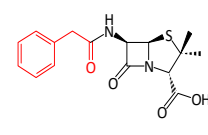
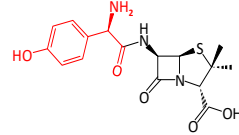
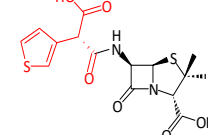
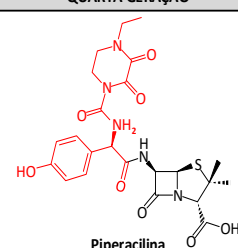
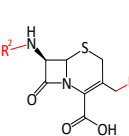
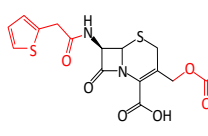
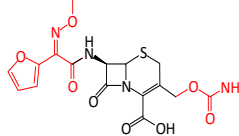
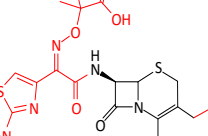
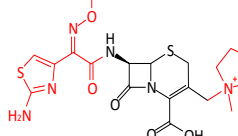
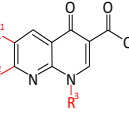
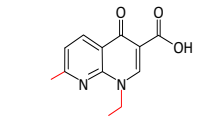
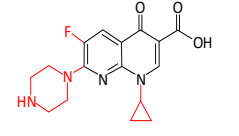
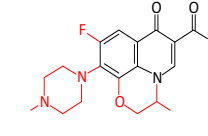
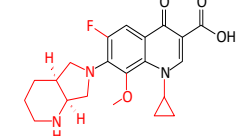
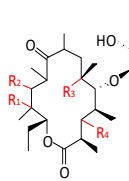
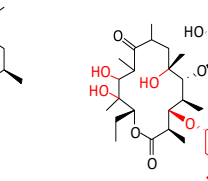
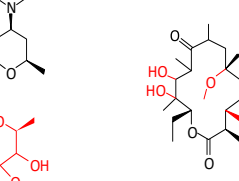
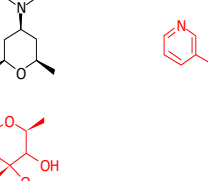
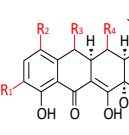
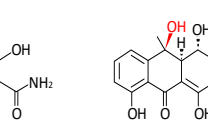
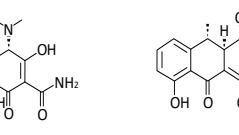
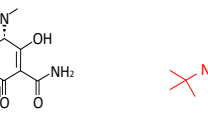
Figura 9: Estrutura geral das penicilinas



Fonte: Adaptado de Wright (1999)

Esse grupo de fármaco são os medicamentos mais utilizados contra bactérias patogênicas, sendo também ativo contra vários bacilos e cocos gram-positivos e gram-negativos e continuam sendo um dos antibióticos mais importantes na terapêutica (GOMES; BATISTA, 2002; JEAN *et al.*, 2013). Na Figura 10 estão relacionadas alguns compostos penicilânicos com diferenças nas suas estruturas.

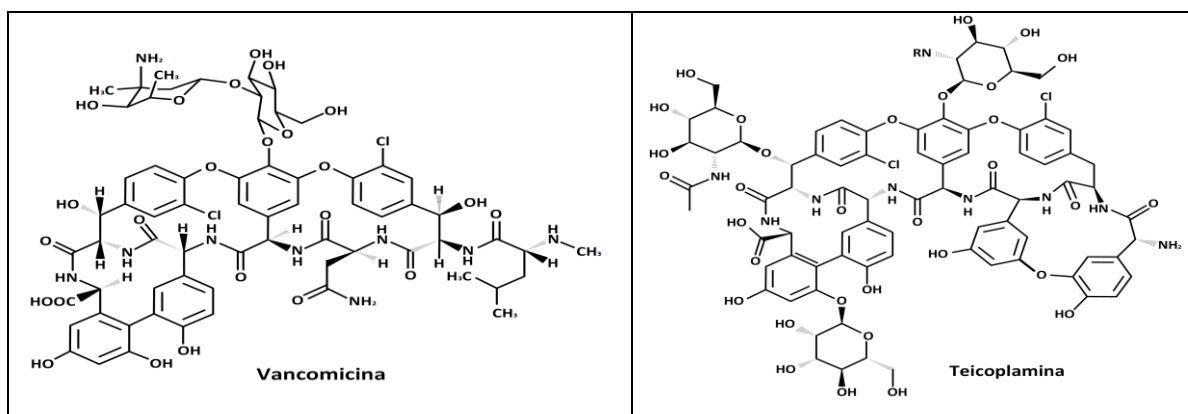
Figura 10: Compostos penicilânicos e antibióticos com diferenças nas suas estruturas

CLASSE QUÍMICA	PRIMEIRA GERAÇÃO	SEGUNDA GERAÇÃO	TERCEIRA GERAÇÃO	QUARTA GERAÇÃO
				
Penicilina	Penicilina G	Amoxicilina	Ticarcilina	Piperacilina
				
Cefalosporinas	Cefalotina	Cefuroxima	Ceftazidima	Cefepima
				
Quinolonas	Ácido nalidíxico	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Moxifloxacina
				
Macrolídeos	Eritromicina	Claritromicina	Telitromicina	
				
Tetraciclínas	Oxitetraciclínas	Doxiciclínas	Tigeciclínas	

Fonte: Adaptado de Wright (1999)

Outra classe de antibiótico utilizada como medicamento, são os glicopeptídeos, que são constituídos por grandes estruturas cíclicas complexas, contendo em sua molécula aminoácidos e açúcares. De forma geral, esses compostos apresentam atividades contra bactérias gram-positivas aeróbias e anaeróbias, não sendo eficazes em atividade contra bacilos gram-negativos. As principais indicações de uso envolvem o tratamento de infecções por *Staphylococcus* resistentes à oxacilina (MURRAY; ARIAS; NANNINI, 2015). Na Figura 11 estão relacionados os dois compostos mais importante dessa classe.

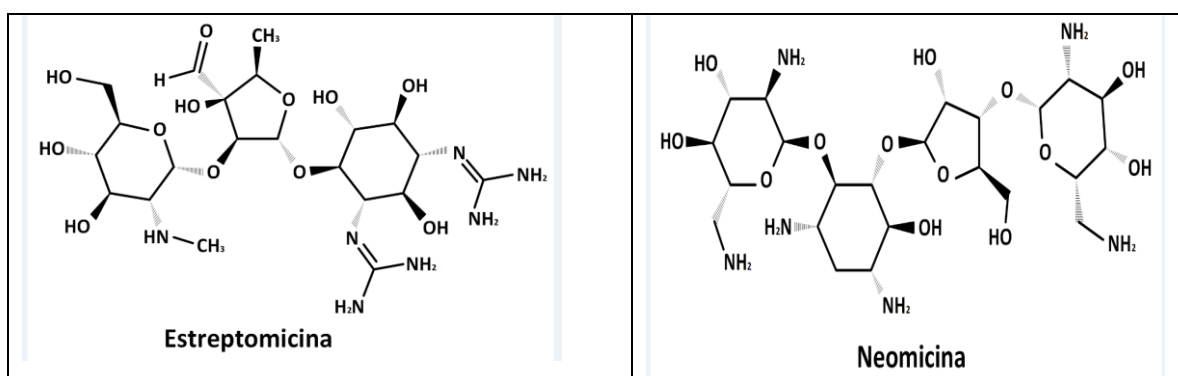
Figura 11: Exemplos de compostos na mesma classe de Antibióticos Glicopeptídeos

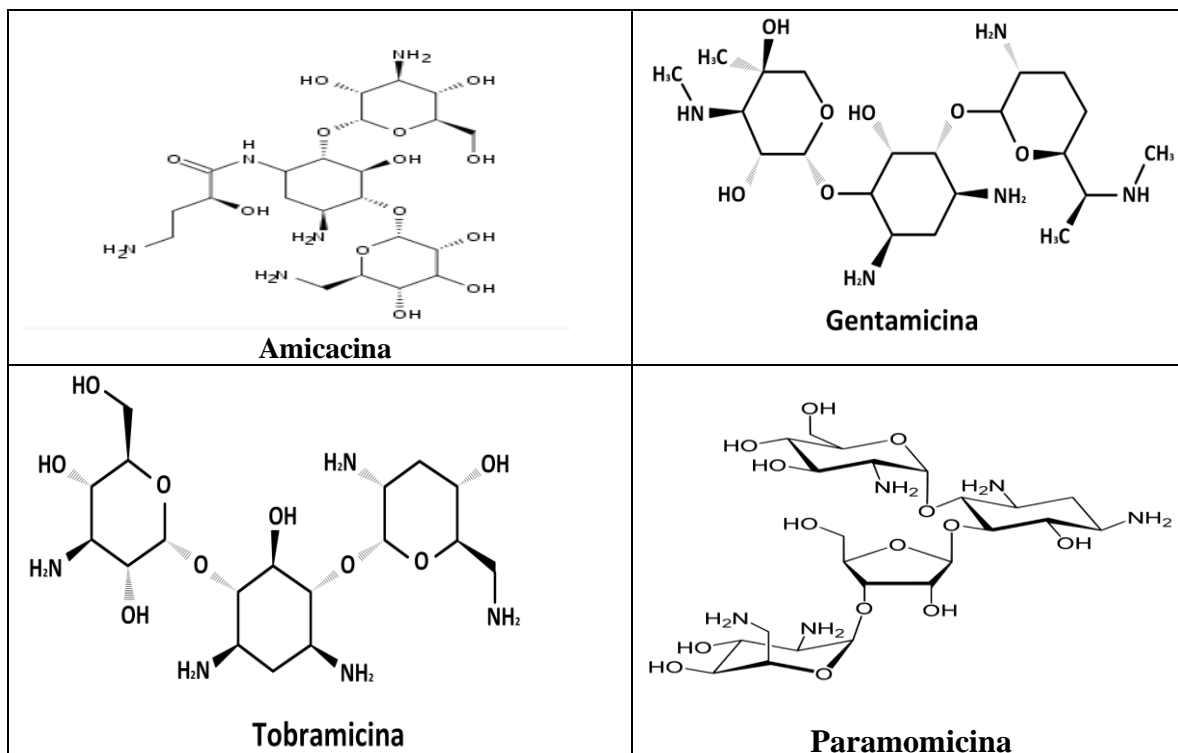


Fonte: Adaptado de Cheung e Williams (1984)

Para o tratamento de animais de grande porte, destinados ao abate, são recomendados os antibióticos aminoglicosídeos. São agentes antimicrobianos frequentemente utilizados em tratamento de infecções causadas por bactérias aeróbicas gram-positivas e gram-negativas, como por exemplo: mastites e enterites, podendo também ser adicionados à alimentação para a prevenção de doenças e para promover o crescimento dos animais (GETEK; VESTAL; ALEXANDER, 1995; BECKER; COOPER, 2013). Essa classe de antibióticos é, também, amplamente utilizada em pacientes com tuberculose multirresistente (DALCOMO, 2012). Como efeitos adversos, os aminoglicosídeos apresentam ototoxicidade predominantemente em uma das porções do ouvido interno (células ciliadas na cóclea e no labirinto) (WU; SHA; SCHACHT, 2002; HUTH; RICCI; CHENG, 2011). A Figura 12 apresenta alguns antibióticos dessa classe.

Figura 12: Exemplos de compostos na mesma classe de Antibióticos Aminoglicosídeos



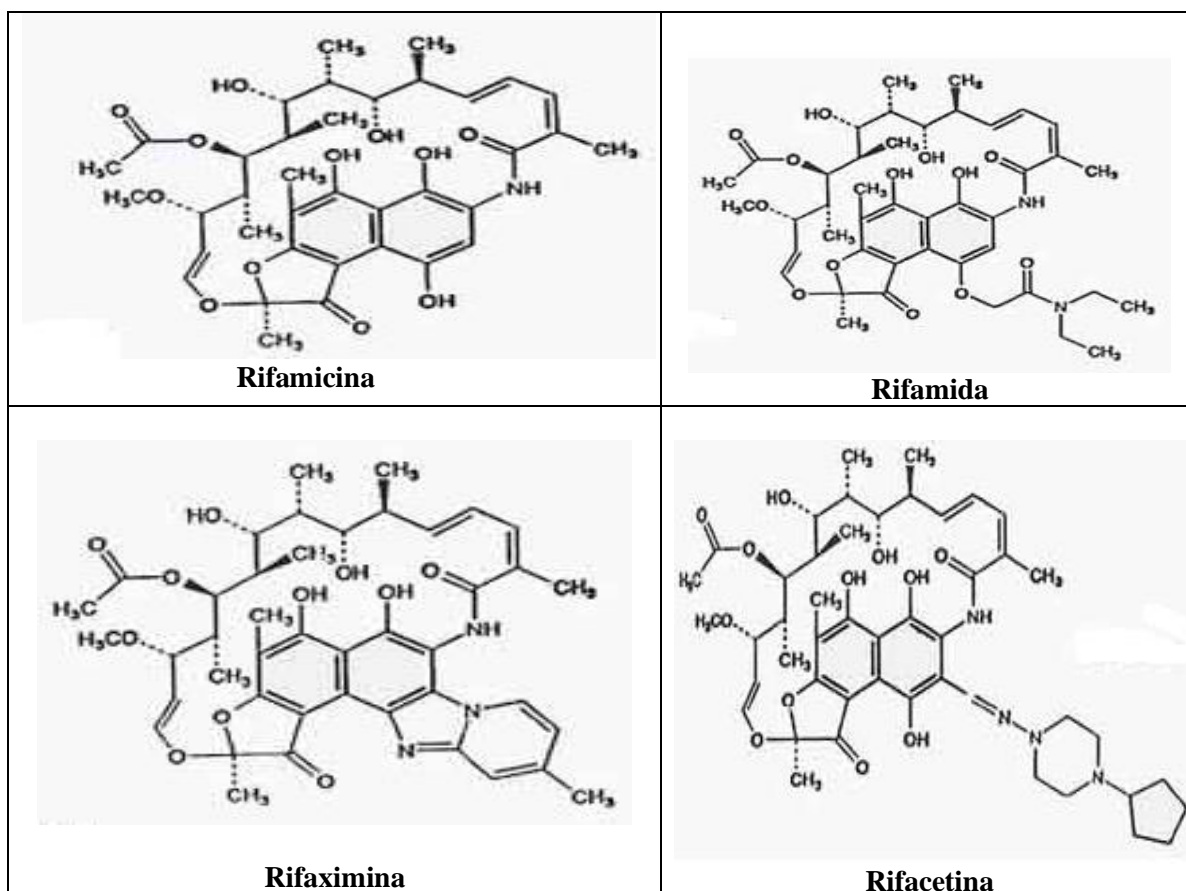


Fonte: Adaptado de Fischbach e Walsh (2009)

As Rifamicinas são antibióticos particularmente eficazes contra microbactérias. São antibióticos macrocíclicos produzidos pelo grupo de bactérias actinomicete e desempenham um papel importante, como antibióticos, na terapêutica contra a tuberculose e várias outras infecções micobacterianas, como diarreias infecciosas (SCARPIGNATO; PELOSINI, 2005). Testes em animais mostraram que essa classe de antibióticos é muito eficaz em inflamação intestinal (BUJNOWSKI *et al.*, 1995).

Dois de seus derivados, semi-sintéticos, mais úteis e utilizados para o tratamento de doenças e distúrbios como tuberculose, câncer, encefalopatia hepática ou infecções intestinais são a rifampicina (RFP) e a rifaximina (RFX) (BUJNOWSKI *et al.*, 1995). A Figura 13 apresenta os principais antibióticos da classe das rifamicinas.

Figura 13: Exemplos de compostos na mesma classe de antibióticos das Rifamicinas

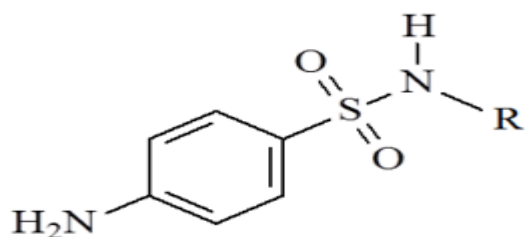


Fonte: Adaptado de Bujnowski *et al.* (1995)

#### 2.4.2 Sulfonamidas (SAs)

Essa importante classe de antibióticos apresenta aplicações terapêuticas destinadas a animais de grande porte e aves para o abate na linha veterinária. Esses compostos são a base para uma grande variedade de medicamentos conhecidos como sulfamidas (JOVANOVIC; STOJANOVIC, 2013). Essa classe é conhecida desde 1940. Desde então, mais de 150 compostos têm sido usados (BARAM *et al.*, 2011). Conhecido como sulfas, são classificados como antimicrobianos bacteriostáticos sintéticos que possuem ação contra diversos agentes patológicos. Na medicina veterinária, os mais utilizados dentro desse grupo são: sufadiazina, sulfadimetoxina, sulfaguanidina e sulfatiazol (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006). Esses compostos são constituídos de um anel benzênico, um grupo amina ( $-NH_2$ ) e um grupo sulfonamida ( $-SO_2NH_2$ ), sendo que os grupos amina (Figura 14) e sulfonamida devem estar na posição “para”, um em relação ao outro, para assim apresentar propriedades antibacterianas (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006; BARAN *et al.*, 2011).

Figura 14: Estrutura geral de uma sulfonamida

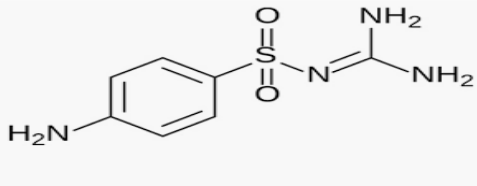
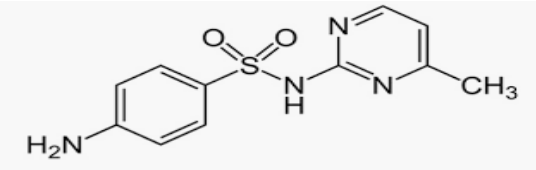
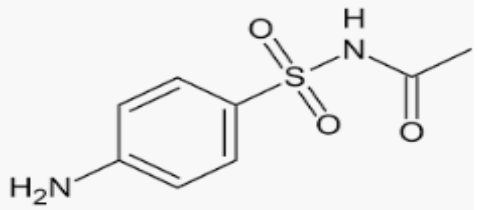
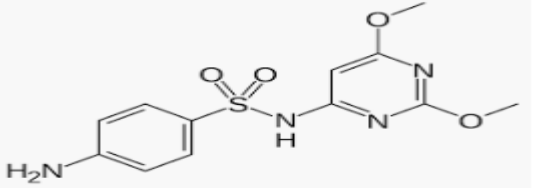
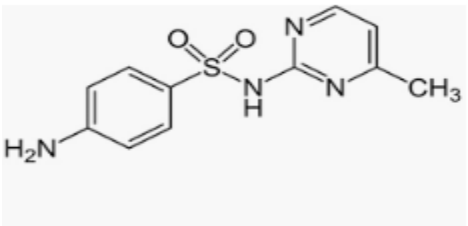
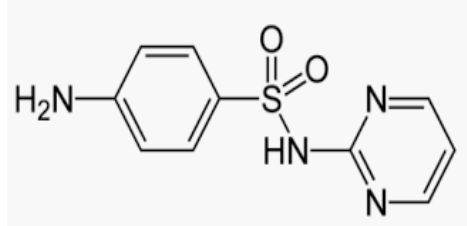
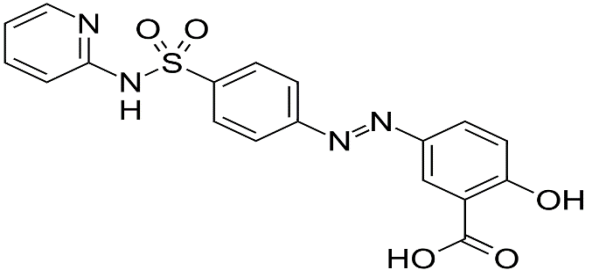
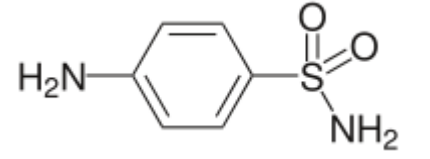
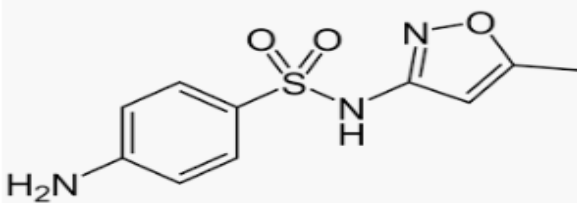
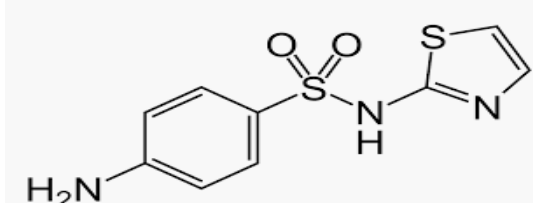


Fonte: Adaptado de Sarmah (2006)

Esse antibiótico apresenta uma ação local significativa, em razão da sua baixa absorção intestinal e tem sido utilizada na medicina veterinária no tratamento de infecções entéricas em aves, diarreia inespecífica, síndrome das aves disenteriforme, cólera aviária e coriza. Também pode ser administrada como um tratamento profilático em infecções intestinais (SARMAH, 2006).

O uso indiscriminado das SAs no tratamento de animais para o abate, confere o aparecimento de resíduos de medicamentos nesses alimentos, sendo sua ingestão prejudicial à saúde humana (MALIK *et al.*, 1994). Alguns efeitos deletérios estão relacionados à alteração da microflora intestinal e, em casos mais graves, podem ocorrer efeitos carcinogênicos e hematotóxicos (MALIK *et al.*, 1994). O limite máximo de resíduos estabelecido pela União Europeia é de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  para a soma de todas as sulfonamidas em matrizes como, leite, mel, ovos, tecidos e músculos produzidos de espécies animais (UNIÃO EUROPEIA, 2002). No Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento também adota o valor de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  para a soma de todas as sulfonamidas, conforme descrito na Instrução Normativa nº 8, de 29 de abril de 2010, que tem como referência a comissão do *Codex Alimentarius* – CAC/FAO/WHO, o comitê do *Codex Alimentarius* sobre Resíduos de Drogas Veterinárias em Alimentos. A Figura 15 mostra, dentro da mesma classe, vários antibióticos derivados de sulfonamidas.

Figura 15: Exemplos de compostos da mesma classe de antibióticos das sulfonamidas

 <p style="text-align: center;"><b>Sulfaguanidina</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>Sulfametazina</b></p>
 <p style="text-align: center;"><b>Sulfacetamida</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>Sulfadimetoxina</b></p>
 <p style="text-align: center;"><b>Sulfamerazina</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>Sulfadiazina</b></p>
 <p style="text-align: center;"><b>Sulfassalazina</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>Sulfanilamida</b></p>
 <p style="text-align: center;"><b>Sulfametoxizol</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>Sulfatiazol</b></p>

Em função da grande utilização das sulfonamidas, em formulações de medicamentos no tratamento de animais destinados ao abate, o desenvolvimento de novos métodos analíticos para a determinação de resíduos em alimentos, torna-se importante e necessário.

#### 2.4.3 Métodos analíticos empregados para a determinação de sulfonamidas

Na literatura são reportadas diferentes técnicas para a determinação de sulfonamidas em amostras alimentícias e farmacêuticas. Dentre elas, podem ser citadas: a cromatografia líquido de alta performance (CLAE) com detector UV ou acoplada a espectrometria de massa, cromatografia gasosa (CG), as quais têm sido amplamente utilizadas e recomendadas por órgãos oficiais e de regulamentação (ANVISA, 2003; BRASIL, 2012; ZHONG *et al.*, 2015). Alguns desses métodos requerem operadores treinados. As análises são demoradas e de alto custo (MSAGATI, 2004). Outros métodos para a determinação de sulfas podem ser utilizados, como: técnicas imunoenzimáticas (como *enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA), (ZHAO *et al.*, 2010), microbiológicos (KRIVOHlavek *et al.*, 2005), colorimétricos (MAUDENS *et al.*, 2004; THOMPSON; NOOT, 2005; ZOTOU; VASILIA DOU, 2006; ZOU *et al.*, 2008), além de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) em fase reversa (MAUDENS, *et al.*, 2004; PANG *et al.*, 2005; ZOTOU; VASILIA DOU, 2006).

Dentre a classe das sulfonamidas, a sulfaguanidina sódica tem se destacado devido à sua grande aplicação no âmbito veterinário (MIZUNO *et al.*, 2012).

Nagaraja *et al.* (2003) citaram o uso de treze reagentes cromogênicos para a determinação de sulfonamidas, utilizando a detecção espectrofotométrica, com uma técnica simples, rápida, de baixo custo e adequada para a automação em análise em fluxo.

Errayes *et al.* (2017) desenvolveram um método utilizando a extração em fase sólida para a determinação de sulfonamidas com detecção espectrofotométrica na região do visível. O limite de quantificação foi de  $0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $0,16 \mu\text{g mL}^{-1}$ . O método foi aplicado para a determinação de sulfas em amostras de águas e formulações farmacêuticas.

Hassania *et al.* (2018) sintetizaram um eletropolímero de acrilamida (PAM), molecularmente impresso, com ação seletiva para sulfaguanidina (SG), para o controle da qualidade de mel. A SG foi detectada por medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e voltametria de pulso diferencial (DPV). Essas técnicas foram aplicadas com sucesso para determinar a SG com excelente seletividade, bem como os limites de

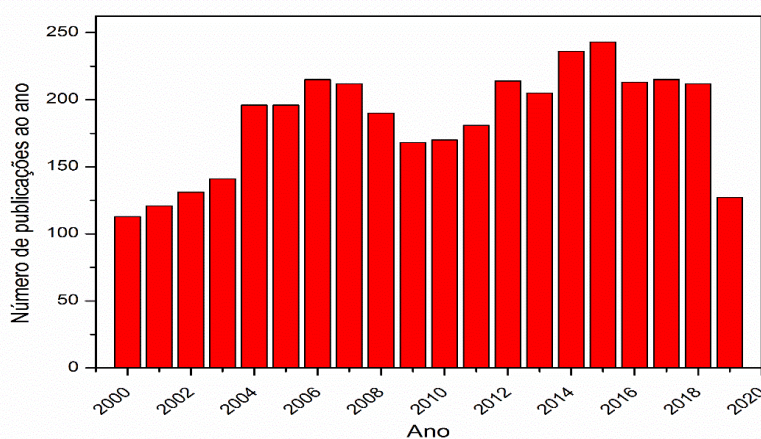
detecção (LD) e a quantificação (LQ) de  $0,20 \text{ pg mL}^{-1}$  e  $0,67 \text{ pg mL}^{-1}$ . A abordagem proposta foi considerada de baixo custo, seletiva e muito sensível, graças à boa biocompatibilidade do composto SG/PAM.

Xu *et al.* (2019) desenvolveram um método rápido (QUEchERS) para a determinação de antibióticos e pesticidas (UPLC MS/MS). Os limites de quantificação variaram entre  $0,1 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1}$  a  $17,3 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1}$  e o método foi aplicado com sucesso em amostras de ovos.

Gajda *et al.* (2019) desenvolveram um método, por espectrometria de massas, para a análise de resíduos de 11 grupos de antibióticos, inclusive as sulfonamidas. O método desenvolvido foi aplicado para a análise confirmatória quantitativa de 53 compostos em penas de frango. O limite de quantificação foi de  $5 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1}$  a  $10 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1}$  para a maioria dos compostos testados.

O controle da saúde animal e o programa de segurança alimentar são itens imprescindíveis para que o Brasil atenda às exigências do mercado interno e externo. Assim, para garantir a inocuidade dos alimentos que são produzidos para o consumo humano, vários métodos analíticos são desenvolvidos e validados para a determinação de antibióticos, permitindo, assim, identificar resíduos decorrentes do uso de medicamentos veterinários e contaminantes ambientais. Em um levantamento nos últimos 20 anos, no site *Science Direct*, buscando por “métodos analíticos para determinação de sulfas”, foram encontradas 3681 publicações, mostrando assim, a importância do desenvolvimento de novos métodos para a determinação de antibióticos. A Figura 16 ilustra a distribuição desses trabalhos, de acordo com o ano de publicação.

Figura 16: Número de publicações nos últimos 20 anos no Web Science Direct com as seguintes palavras-chave: “métodos analíticos para determinação de sulfas”



## 2.5 Pesticidas

Os pesticidas organofosforados (OPs) têm sido largamente utilizados na agricultura e na pecuária moderna em função da sua eficácia como inseticida (LIU *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2015). O ataque por microrganismos, tais como fungos e bactérias, é, provavelmente, uma das causas mais sérias de perdas pós-colheitas de produtos perecíveis. Dessa forma, os pesticidas são substâncias usadas para o controle e a prevenção de pragas para os organismos nocivos presentes na agricultura. Na pecuária, esses compostos também são muito utilizados para a desinfecções nas instalações onde os animais são criados. A sua ação está relacionada com a sua eficiência em determinados organismos ou pragas. Alguns são tão potentes que afetam a saúde animal e humana (RASTOGI *et al.*, 2017; CHENG *et al.*, 2017, OGASAWARA *et al.*, 2017).

A aplicação de pesticidas, principalmente os organoclorados, usados para o controle de pragas, foi gradativamente substituída por compostos organofosforados, por serem mais biodegradáveis e apresentarem menor tempo de residência no meio ambiente (YU *et al.*, 2016).

Segundo a ANVISA (BRASIL, 2012), entre os anos de 2002 a 2012, o mercado mundial de pesticidas cresceu 93%, sendo que o mercado brasileiro cresceu 190% no ano de 2008, contribuindo para que o Brasil se tornasse o maior consumidor de pesticidas do mundo (BRASIL, 2012). De acordo com o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), somente no ano de 2013 foram vendidos no Brasil, aproximadamente, 495 mil toneladas desses compostos, sendo que a grande maioria foi de herbicidas, conforme mostrado na Tabela 1 (IBAMA, 2016).

Tabela 1: Vendas de produtos formulados divididos por classe no Brasil em 2013 (IBAMA - 2016).

<b>Classe de Uso</b>	<b>Quantidade (Toneladas de ativos)</b>	<b>Porcentagem (%)</b>
Herbicida	303.573,23	61,23
Inseticida	56.993,88	11,50
Fungicida	54.030,27	10,90
Inseticida (acaricida)	31.725,65	6,40
Outros	49.441,51	9,97

Fonte: IBAMA (2016)

Quanto à classificação, os pesticidas são agrupados conforme a sua composição química, função e modo de ação nos organismos. Eles podem ser divididos em agentes biológicos, inorgânicos e orgânicos, de origem sintética ou natural, sendo, na maioria, constituídos por misturas complexas de moléculas orgânicas (ZUIN; VILEGAS, 2000; WARE; WHITANE, 2004).

Esses compostos podem ser divididos em 4 classes distintas: Organoclorados, Carbamatos, Organofosforados e Piretróides (sendo esse último o menos utilizado).

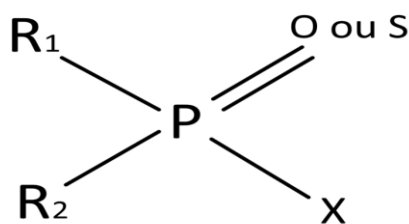
Os pesticidas organoclorados tiveram funções importantes dos anos 40 até os anos 60. Dentro desse grupo se destacam o diclorodifeniltricloroetano (DDT), a Dieldrina, a Aldrina, a Endrina, o Heptacloro, o Lindano, dentre outros (ZUIN; VILEGAS, 2000; WARE; WHITANE, 2004). Compostos pertencentes a essa classe de pesticidas têm como principais características: baixa volatilidade, elevada estabilidade química, lipossolubilidade, lentas taxas de degradação e biotransformação. São resistentes no ambiente e, portanto, propícios à bioconcentração e bioamplificação ao longo da cadeia alimentar (LÓPEZ *et al.*, 2007; DEROUICHE *et al.*, 2007; BALA *et al.*, 2017).

Outra classe de pesticidas sintetizados nos anos 30, se refere aos carbamatos, que são ésteres alifáticos. Nessa época foram comercializados como fungicidas por possuírem baixa atividade inseticida. Durante a década de 50, foi sintetizado o aril éster, derivado do ácido metilcarbâmico, que apresentava potente ação inseticida (ECOBICHON, 2001). Os carbamatos geralmente são aplicados na agricultura quando as infestações por pragas se tornam resistentes aos compostos organofosforados. Dos vários compostos pertencentes a esse grupo, destacam-se o Aldicarbe, Carbarilo e o tris-dietildimetilcarbamato de zinco, sendo esse último muito utilizado em animais de pequeno porte para controle de pulgas e carrapatos.

A classe dos piretróides, se refere a compostos sintéticos similares às piretrinas, substâncias encontradas nas flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* (BRADBERRY *et al.*, 2005). Essa classe de pesticidas possui ação inseticida, sendo instável e se degradando facilmente quando expostas à luz (SHAFER; MEYER; CROFTON, 2005).

Os pesticidas organofosforados apresentam nas suas estruturas, principalmente, átomos de C e P, que são lipossolúveis, são compostos orgânicos degradáveis, contendo ligações carbono-fósforo. Esses compostos são ésteres, amidas ou derivados tióis dos ácidos fosfórico, fosfortióico, fosfonotióico ou fosfônico (Figura 17).

Figura 17: Fórmula geral dos organofosforados. R1 e R2 radicais alquil ou aril



Fonte: Adaptado de Shafer; Meyer e Crofton (2005)

Compostos dessa classe apresentam toxicidade aguda mais elevada para humanos e outros mamíferos, pois são inibidores da enzima acetilcolinesterase, muito utilizada como parâmetro para avaliar a toxicidade de pesticidas e herbicidas, causando acúmulo de acetilcolina nas fibras nervosas, interrompendo a transmissão de novos impulsos e gerando danos ao organismo humano, como convulsões, parada respiratória e, em alguns casos graves de intoxicação, levando a óbito (MARASCHIN, 2018; RANGEL, 2008; ARAÚJO, 2011).

Muito utilizado na agropecuária brasileira, os pesticidas organofosforados podem ser encontrados em duas formas: como sólidos brancos ou líquidos amarelos com odor semelhante às mercaptanas, solúveis em solventes orgânicos. Apresentam baixa solubilidade em água e são instáveis, podendo ser degradados pela luz e em meio alcalino (CONCEIÇÃO, 2002). Devido ao seu reduzido tempo de meia-vida, têm, gradualmente, substituído os pesticidas organoclorados (ZUIN; VILEGAS, 2000; WARE; WHITANE, 2004).

Os organofosforados podem ser divididos em grupos, de acordo com o átomo ligado por dupla ligação com fósforo, a saber, os fosfatos (P=O) e os fosforotioatos (P=S) (VALE, 1998), sendo que os fosfatos são menos lipofílicos que os fosforotioatos. Nos fosforamidatos, o carbono está ligado ao fósforo através de um grupamento –NH. O grupo X (Figura 17) pode ser qualquer grupamento alifático (ramificado ou não), aromático ou heterocíclico ligado ao fósforo de forma lábil (através de O ou S substituição), sendo o grupo de partida (VALE, 1998; BALA *et al.*, 2017).

Os radicais R1 e R2 (Figura 17) podem ser uma dupla de radicais metila, etila ou ainda isopropila, podendo ser responsáveis pela toxicidade do OP. Os diisopropil-OPs são os mais tóxicos devido à sua maior interação com os resíduos do sítio ativo da enzima acetilcolinesterase, enzima responsável pela inativação do neurotransmissor acetilcolina (VALE, 1998; PAUDYAL, 2008).

As vias de contaminação por esses compostos se dão por: absorção cutânea, por ingestão e inalação. As intoxicações agudas podem provocar: convulsões, náuseas, vômitos,

salivação, lacrimejamento, dores e cólicas abdominais, além de dificuldades respiratórias. Intoxicações crônicas surgem após intervalos variáveis e podem estar associados às alterações cromossômicas à teratogênese, infertilidade masculina, carcinogênese, neurotoxicidade, doenças respiratórias, hepáticas, renais e dermatológicas (PIRES; CALDAS; RECENA, 2005; KUMAR *et al.*, 2016). O tratamento dado às intoxicações por organofosforados, baseia-se, principalmente, no uso da atropina, antídoto sintomático e, com menor frequência, antídotos específicos que reativam a colinesterase (CAVALIERE *et al.*, 1996). A Tabela 2 mostra alguns exemplos de pesticidas organofosforados, de acordo com os grupamentos ligados ao átomo de fósforo.

Tabela 2: Exemplos de pesticidas organofosforados de acordo com os grupamentos éster ligados ao átomo de fósforo

<b>Dimetil-OP</b>	<b>Dietil-OP</b>	<b>Diisopropil-OP</b>
Diclorvós	Diazinon	diisopropilfluorofosfato
Temefós	Clorpirifós	Diisopropilmetilfosfato
metil-paration	Tetraetilpirofosfato	
Malation	Paration	
Fention	Cumafós	
Dimetoato	Sulfotepp	
Metamidofós	Etion	

Fonte: Paudyal (2008) e Assis *et al.* (2011)

No Brasil, a classificação toxicológica para os organofosforados está sob a responsabilidade do Ministério da Saúde, que leva em conta a dose letal DL<sub>50</sub>. Por determinação da Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989, todos os rótulos dos pesticidas devem apresentar uma faixa colorida, mostrando o seu grau de toxicidade (BRASIL, 1989). A Tabela 3 evidencia a classificação da dose letal de agrotóxicos no Brasil.

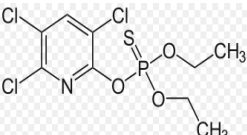
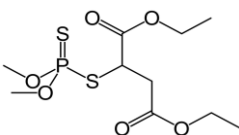
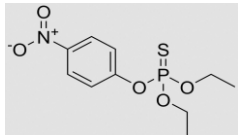
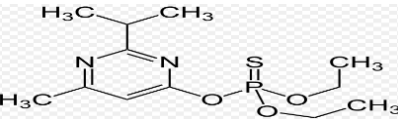
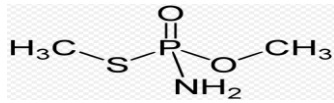
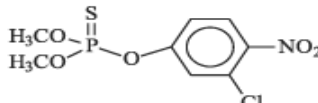
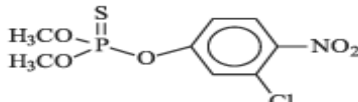
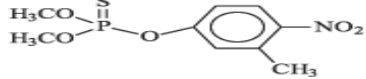
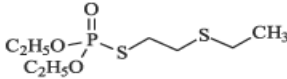
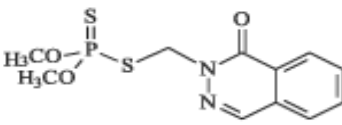
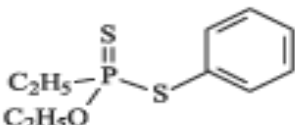
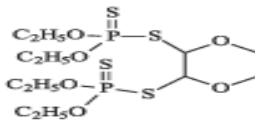
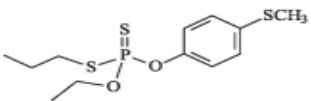
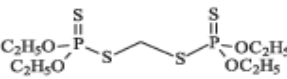
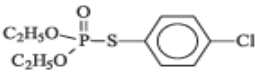
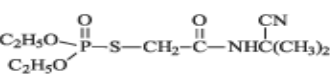
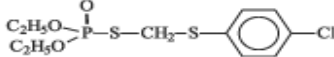
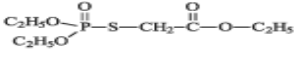
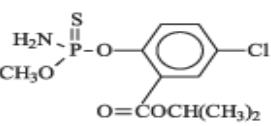
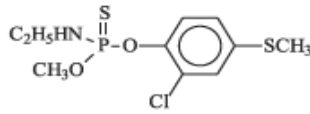
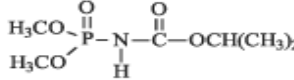
Tabela 3: Classificação da dose letal de agrotóxicos no Brasil

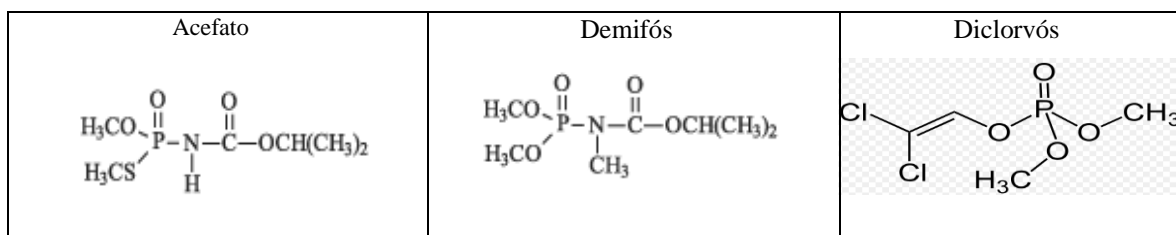
<b>Grupos Tóxicos</b>	<b>Cor</b>	<b>Classe</b> *	<b>DL50 (mg Kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Dose capaz de matar uma pessoa</b>
Extremamente	<b>Vermelha</b>	I	5	1 pitada, algumas gotas
Altamente	<b>Amarela</b>	II	5 – 50	Algumas gotas -1 colher de chá
Medianamente	<b>Azul</b>	III	50 – 500	1 colher de chá – 2 colheres de sopa
Pouco	<b>Verde</b>	IV	500 – 5000	2 colheres de sopa – 1 copo
Muito pouco	<b>Verde</b>	V	> 5000	1 copo – 1 litro

Fonte: Brasil (1989)

Na Figura 18 estão relacionados os principais organosfosforados utilizados no combate de pragas em infestações agrícolas e em animais de grande porte destinados ao abate para o controle de carrapatos.

Figura 18: Estruturas de alguns pesticidas utilizados na agropecuária brasileira

<p>Clorpirifós</p> 	<p>Malation</p> 	<p>Paration</p> 
<p>Diazinon</p> 	<p>Metamidofós</p> 	<p>Clortion</p> 
<p>Fention</p> 	<p>Fenitroton</p> 	<p>Demeton</p> 
<p>Azinfós – metil</p> 	<p>Fonofós</p> 	<p>Dioxation</p> 
<p>Sulprofós</p> 	<p>Etion</p> 	<p>Dissulfoton</p> 
<p>Fulgition</p> 	<p>Tartan</p> 	<p>Acetofós</p> 
<p>Isocarbofós</p> 	<p>Amidotioato</p> 	<p>Avenin</p> 



Fonte: Santos *et al.* (2007)

No Brasil, a lei dos agrotóxicos (Lei Federal no 7.802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto 4.074, de 4 de janeiro de 2002), no Art. 1º, estabelece que a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, serão regidos por essa Lei.

É de responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, em conjunto com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, dentro do domínio de suas respectivas áreas de competência, avaliar e classificar toxicologicamente os agrotóxicos e monitorar os resíduos em alimentos de origem vegetal e animal.

Atualmente, 238 pesticidas possuem LMR (Limite Máximo de Resíduos) estabelecidos para uma variedade de produtos alimentares no país (ANVISA, 2014), dentre eles, os grãos armazenados, como: amendoim, arroz, café, cevada, feijão, milho, soja, trigo, dentre outros.

Estão em vigor dois programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal e animal: o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), coordenado pela ANVISA, e o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), coordenado pelo MAPA. O relatório com os resultados obtidos pelo programa PARA são postados anualmente no site da ANVISA e os do PNCRC são publicados no Diário Oficial da União.

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2004) estabelece um parâmetro de classificação em relação ao grau de toxicidade exibido por esses compostos, que são baseados na toxicidade aguda oral e dérmica verificada em algumas espécies. Alguns países que não dispõem de um sistema organizado de registro de agrotóxicos, adotaram limites instituídos pelo *Codex Alimentarius* na sua legislação. O Brasil seguiu os limites de resíduos de agrotóxicos até 1990, após, a Legislação Federal de Agrotóxicos e Afins regulamentou e estabeleceu o Limite Máximo de Resíduo (LMR), (BRASIL, 1999; CALDAS, 2004; CODEX, 2012).

### 2.5.1 Métodos Analíticos Empregados para a Determinação de Organofosforados

Na literatura são reportados diferentes métodos para a determinação de organofosforados em amostras de águas, efluentes residuais, plasma e em alimentos. Dentre eles podem ser citados: métodos potenciométricos, espectrofotométricos, enzimáticos e cromatográficos (GC), (CL/MS; CL MS/MS; CL -UV), dentre outros.

Peng *et al.* (2015) desenvolveram um método para a determinação de organofosforados em soro humano, usando extração em fase sólida por cromatografia de permeação em gel (GPC -SPE) e cromatografia gasosa acoplado com espectrometria de massa (GC/MS). Esse método foi aplicado para a determinação de sete organofosforados, apresentando recuperação acima de 85%. O menor limite de detecção entre os organofosforados estudado foi de 4,2 ng L<sup>-1</sup>.

Pei *et al.* (2017) utilizou um método simples para a determinação de sete organofosforados em amostras de urina. Nessa metodologia foi usada cromatografia líquido acoplada à espectrometria de Massa (LC-MS/MS). As amostras foram concentradas em cartuchos de Extração WAX Oasis (60 mg, 3 mL) obtidos da empresa Waters (Milford, MA, EUA). Os resultados mostraram que os limites de detecção e os limites de quantificação dos sete OPs variaram de 0,005 µg L<sup>-1</sup> a 0,2 µg L<sup>-1</sup> e 0,02 µg L<sup>-1</sup> a 0,5 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente. O método apresentou boa precisão e foi aplicado na determinação de organofosforados em dez amostras de urina da população da cidade de Guangzhou (China). As concentrações dos organofosforados variaram entre 0,5 µg L<sup>-1</sup> e 6,7 µg L<sup>-1</sup>.

Em outro trabalho, Liu *et al.* (2018) desenvolveram um método para a determinação de organofosforado, em amostras de peixe congelado, utilizando a extração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massa. O método proposto foi aplicado em amostras de peixe, a faixa linear obtida foi de 0,004 ng g<sup>-1</sup> a 0,059 ng g<sup>-1</sup> e com limite de detecção de 0,039 ng g<sup>-1</sup>.

Wang *et al.* (2018) desenvolveram um nanocompósito magnético de grafeno para a extração de organofosforados em amostras de água. Para a quantificação do analito foi usada a técnica de cromatografia gasosa, com a detecção fotométrica de chama (CG-FPD). A faixa linear de resposta para o método foi de 10 µg L<sup>-1</sup> e 24 µg L<sup>-1</sup> e o limite de detecção (LD) de 16 µg L<sup>-1</sup>.

Boulanouar *et al.* (2018) sintetizaram um polímero molecularmente impresso para a extração de pesticidas organofosforados em amostras complexas (vegetais e frutas). Após a

extração do analíto, o mesmo foi quantificado, usando CLAE. O limite de quantificação foi de  $0,13 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Hao *et al.* (2018), também, desenvolveram um método por cromatografia líquido, acoplado com espectrometria de massas, para a determinação de doze organofosforados em amostras de águas superficiais e efluentes de águas residuárias. O método proposto apresentou limites de detecção para os organofosforados, variando entre  $1,5 \text{ ng L}^{-1}$  e  $30 \text{ ng L}^{-1}$ .

Aimer, Benalid e Serrano (2019) desenvolveram uma técnica para a degradação de resíduos de pesticidas em áreas contaminadas. No trabalho foi realizada a oxidação química do composto organofosforado dimetoato, com radicais sulfato e hidroxila. A concentração de dimetoato foi medida por cromatografia líquido de alta performance, conectada com um detector por espectrofotometria ultravioleta-visível (CLAE-UV). O limite de detecção do método foi de  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$  e o limite de quantificação de  $1,1 \mu\text{g L}^{-1}$ .

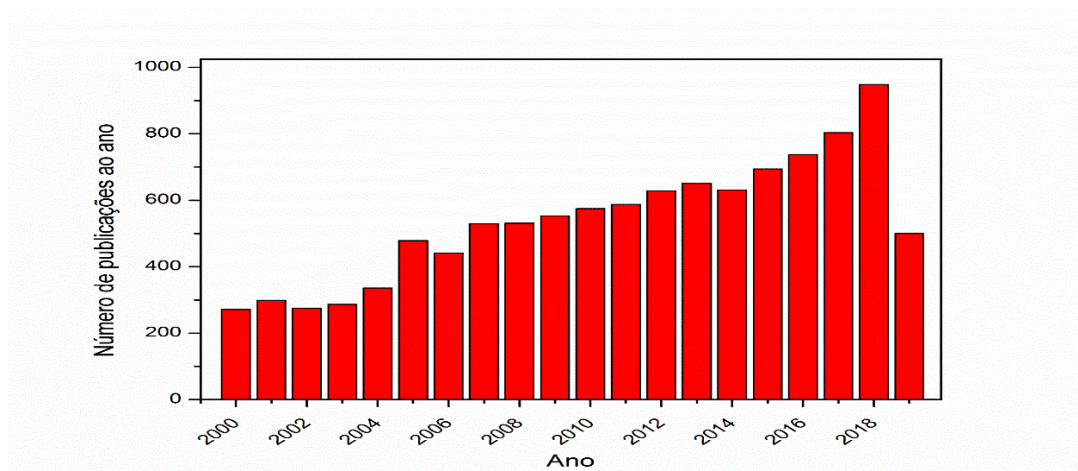
A maioria dos métodos, para análise de organofosforados, utiliza de técnicas de custo elevado, além de serem morosos. Em contrapartida, a espectrofotometria UV-vis. pode ser utilizada para a análise desses compostos, devido à disponibilidade da instrumentação, à simplicidade do procedimento, ao baixo custo envolvido, ao menor tempo de análise, com boa precisão e exatidão da técnica.

Métodos analíticos para a determinação de organofosforados usando técnicas espectrofotométricas também são reportados: Silva (2011) usou sistema de análise em fluxo associada a um biossensor enzimático (acetil colinesterase), com detecção espectrofotométrica para a determinação dos pesticidas clorpirifós, paration, diclorvos e malation. Nesse trabalho, foram encontrados limites de detecção entre  $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  e  $10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ .

Durante o controle de pragas no campo, muitas vezes há necessidade da aplicação de vários pesticidas numa mesma cultura. Para que seja possível monitorar o uso dessas substâncias nos diversos alimentos, são necessários métodos analíticos capazes de detectar e quantificar vários resíduos num mesmo procedimento. Esses métodos são conhecidos como métodos multirresíduos (MMR).

Em levantamento bibliográfico, no site Science Direct, buscando pela frase “métodos analíticos para determinação de organofosforados”, consultado em março 2019, nos últimos 20 anos, foram encontradas 9829 publicações envolvendo métodos analíticos propostos para a determinação de organofosforados, mostrando assim, a importância do desenvolvimento de novos métodos para a determinação de pesticidas. A Figura 19 ilustra a distribuição desses artigos, de acordo com o ano de publicação.

Figura 19: Número de publicações nos últimos 20 anos no *Science Direct* com as seguintes palavras-chave: “métodos analíticos para determinação de organofosforados”



Fonte: Science Direct (2019)

### 3 OBJETIVOS

Segue a descrição do objetivo geral e dos específicos:

#### 3.1 Objetivo Geral

I -Desenvolver um método empregando análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de Sulfaguanidina Sódica em formulações farmacêuticas e amostras alimentícias;

II- Sintetizar um material magnético a base de nanotubo de carbono de acesso restrito (M-RACNT) para a pré-concentração, separação e determinação de pesticidas organofosforados em matrizes alimentícias de elevado teor proteico.

#### 3.2 Objetivos Específicos

a) Para a Determinação on-line de sulfaguanidina sódica em amostras de formas farmacêuticas sólidas, semissólidas e em alimentos como: leite, ovos e fígado de frango, as atividades desenvolvidas foram:

I. Otimização do método on-line, proposto, usando técnicas multivariadas;

II. Avaliar a presença de interferentes na amostra;

III. Aplicação do método desenvolvido em amostras de formas farmacêuticas e alimentos;

b) Para a Determinação on-line de organofosforados usando extração em fase sólida com nanotubos de carbono magnéticos de acesso restrito (M-RACNT), aplicando em amostras de alimentos como: berinjela, brócolis, couve-flor, leite de soja e vagem verde, as atividades desenvolvidas foram:

- I. Síntese do material magnético de acesso restrito;
- II. Caracterização desse material por técnica de microscopia eletrônica de transmissão (TEM);
- III. Avaliação da capacidade de exclusão de proteína do material sintetizado por CLAE;
- IV. Otimização das variáveis pertinentes ao sistema FIA proposto e otimização do método de extração em fase sólida dispersiva;
- V. Aplicação do método otimizado em amostras alimentícias com teor proteico.

## 4 DETERMINAÇÃO DE SULFAGUANIDINA SÓDICA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS

Neste tópico será descrita a metodologia detalhada utilizada neste trabalho.

### 4.1 Metodologia Experimental

Neste item está descrita a instrumentação empregada e a metodologia utilizada para: preparo de soluções e amostras, sistema de análise em fluxo, métodos usados para a comparação (CLAE), figuras de méritos e estudo de interferentes. Os experimentos foram feitos no Laboratório de Análise Química de Fármacos da UNIFAL – MG e no Laboratório de Controle de Qualidade da Jofadel Ind. Farmacêutica Veterinária.

### 4.2 Instrumentação

As medidas de absorbância foram obtidas usando um espectrofotômetro de absorção molecular UV-visível (BIOSPECTRO SP-220) de feixe simples, com cela de fluxo (Figura 20) com 0,5 cm de caminho ótico e com 0,8 mL de volume interno.

Figura 20: Célula de fluxo de quartzo ES, (Hewlett Packard, EUA)



Fonte: O autor (2015)

A absorção da radiação foi monitorada no comprimento de onda de 545 nm e a aquisição dos dados foi feita com um *software* elaborado em linguagem *Visual Basic*.

Para o sistema FIA proposto, usou-se uma bomba peristáltica de 8 canais (Ismatec IPC-08, Suíça) com tubos de Tygon® de diferentes diâmetros e para o sistema em fluxo, tubos de polietileno (0,8 mm diâmetro interno) foram usados para a propulsão dos fluidos, um

injetor de acrílico (Figura 21) foi utilizado para a comutação das etapas de amostragem e injeção da amostra. Para o aquecimento dos reatores  $R_1$  e  $R_2$  foi empregado um banho termostático (Quimis Q 214 M.).

Figura 21: Injetor comutador utilizado no sistema de análise em fluxo



Fonte: O autor (2015)

A exatidão, do método proposto, foi atestada usando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (*Shimadzu SPD-10A*) equipado com um detector UV. As condições otimizadas para as análises cromatográficas foram: volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ , vazão de fluxo de 0,8  $\text{mL min}^{-1}$ , temperatura do forno de 30°C, coluna  $C_{18}$  (MVTM 100 Å, 250 mm x 4.6 mm Varian) e uma pré-coluna  $C_{18}$  (4,6 mm x 2 mm Varian) com tempo de corrida de 6 minutos (MALITAN, 2006).

### 4.3 Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada produzida em um sistema Milli-Q system (Millipore, EUA).

As soluções padrão de trabalho da sulfaguanidina sódica foram preparadas semanalmente. A solução estoque de 1000  $\text{mg L}^{-1}$  foi obtida pela dissolução de 100 mg de sulfaguanidina sódica (Sigma-Aldrich), com 30 mL de HCl 0,18  $\text{mol L}^{-1}$ , quantitativamente transferidas para balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água Milli-Q. Para a curva analítica, soluções padrão foram preparadas, a partir de diluições da solução estoque, nas concentrações de 0,03  $\text{mg L}^{-1}$ ; 0,5  $\text{mg L}^{-1}$ ; 1,0  $\text{mg L}^{-1}$ ; 2,0  $\text{mg L}^{-1}$ ; 3,0  $\text{mg L}^{-1}$ ; 5,0  $\text{mg L}^{-1}$ ; 7,0  $\text{mg L}^{-1}$  e 9,0  $\text{mg L}^{-1}$ .

A fase móvel usada no HPLC foi composta pela mistura de 30% (v/v) de solução de acetado de sódio (Neon) 0,05  $\text{mol L}^{-1}$  (pH = 4,5) e 70% (v/v) de acetonitrila (Sigma-Aldrich) em um balão de 100 mL. Antes da injeção da fase móvel no sistema cromatográfico, ela foi sonicada e filtrada em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  de nylon (Millipore) (MALITAN, 2006).

#### 4.4 Preparo das Amostras

As amostras utilizadas neste trabalho foram de formas farmacêuticas sólidas, semissólidas e alimentos como fígado de frango, leite e ovos.

##### 4.4.1 Formulações farmacêuticas sólidas, semissólidas e amostras de leite, ovo e fígado de frango

As amostras comerciais de medicamentos contendo sulfaguanidina sódica foram adquiridas em farmácias locais e clínicas veterinárias. A Tabela 4 apresenta as amostras, bem como o valor nominal declarado pelo fabricante para cada formulação.

Tabela 4: Formulações/amostras contendo sulfaguanidina sódica com os seus respectivos valores nominais declarados pelos fabricantes

<b>Amostras</b>	<b>Forma Farmacêutica</b>	<b>Valor Nominal declarado <sup>a</sup></b>
A	Sólida (pó de uso oral)	200 mg g <sup>-1</sup>
B	Sólida (pó de uso oral)	150 mg g <sup>-1</sup>
C	Sólida (pó de uso oral)	220 mg g <sup>-1</sup>
D	Sólido (matéria-prima)	998 mg g <sup>-1</sup>
E	Semissólida (pomada)	74 mg g <sup>-1</sup>

<sup>a</sup> Valor declarado pelo fabricante

Fonte: Valores declarado pelo fabricante nas embalagens das amostras (2016).

Para o preparo das amostras de formulações farmacêuticas sólidas e semissólida, pesou-se uma massa da amostra contendo o equivalente a 100 mg de sulfaguanidina sódica (e.g. 500 mg da amostra A), a qual foi transferida para um béquer, contendo 30 mL de HCl 0,18 mol L<sup>-1</sup>. A mistura ficou sob agitação magnética por 10 minutos, sendo, na sequência, submetida a um banho ultrassônico por mais 10 minutos (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Posteriormente, a solução foi transferida para balão volumétrico de 100 mL e avolumado com água deionizada. Uma alíquota de 0,55 mL, dessa solução, foi diluída para balão volumétrico de 100 mL e avolumado com água deionizada. A concentração final de sulfaguanidina sódica no balão foi de 5,5 mg L<sup>-1</sup>. Essa solução foi então filtrada em membrana

PTFE de 0,22  $\mu\text{m}$ , posteriormente sonicada e analisada pelo método FIA e pelo método comparativo por CLAE.

Quanto ao preparo das amostras de formulações farmacêuticas semissólidas, procedeu-se da seguinte forma, pesou-se uma massa da amostra equivalente à concentração de 100 mg de sulfaguanidina sódica, a qual foi transferida para um funil de separação de 250 mL, contendo 30 mL de éter etílico. Posteriormente, foram adicionadas três porções de 15 mL de HCl 0,18 mol L<sup>-1</sup>, para cada adição de HCl 0,18 mol L<sup>-1</sup>, o sistema foi agitado e deixado em repouso por 15 minutos (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). A fase aquosa foi então recolhida para balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água. Um volume de 0,55 mL dessa solução foi diluído com água para balão de 100 mL, obtendo uma concentração final igual a 5,5 mg L<sup>-1</sup>. Posteriormente, a solução foi filtrada em membrana PTFE de 0,22  $\mu\text{m}$ , sonicada e uma alíquota dessa solução foi então submetida à análise pelo método proposto FIA e pelo CLAE.

As amostras de leite, ovo e fígado de frango foram doadas pela Jofadel Indústria Farmacêutica Veterinária da Cidade de Varginha (MG), sendo amostras provenientes de testes de resíduos de sulfaguanidina sódica para a determinação de período de carência. Devido à complexidade das matrizes e a possibilidade da existência de interferentes, as amostras de leite bovino, ovo e fígado de frango, foram submetidas a uma etapa de extração antes das medidas pelo método proposto por FIA e pelo método comparativo por CLAE.

Para o preparo das amostras de leite, foi usada a técnica de extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura (ELL-PBT). O procedimento foi semelhante ao descrito por Goulart *et al.* (2010). Essa técnica (ELL-PBT) consistiu na adição de um solvente miscível (acetoneitrila) à amostra em uma proporção de 2:1 (v/v). Após a adição da acetoneitrila, a amostra sofreu agitação por 10 minutos com o uso de um processador (Mixer RI 1364/09 Mini Processador 400W), formando assim, uma fase líquida única contendo o leite e acetoneitrila. A mistura foi então transferida para tubos de polietileno, de 30 mL e resfriados a 10°C por 30 minutos. Na sequência, os tubos foram centrifugados durante 15 minutos a 500 rpm. A mistura formada pela fase líquida e o material sólido do leite foi levado ao freezer e resfriado a -20°C por um tempo 3h até a separação das fases. Com a diminuição da temperatura, o material sólido (fundo do tubo) foi aprisionado na fase aquosa congelada. A acetoneitrila (fase orgânica com temperatura de congelamento de -46°C) permaneceu líquida e foi separada facilmente.

Posteriormente, a fase orgânica (acetoneitrila) foi filtrada em membrana PTFE de 0,22  $\mu\text{m}$ , recolhida e evaporada em um rotaevaporador a 40°C. O material resultante no tubo, foi ressuspenso em 5 mL de solução de ácido clorídrico 0,18 mol L<sup>-1</sup>, sendo na sequência

sonicados por 10 minutos. A mistura então foi centrifugada durante 15 minutos a 500 rpm, novamente filtrado em membrana PTFE de 0,22  $\mu\text{m}$  e submetido à análise pelo método proposto FIA e pelo método oficial CLAE.

Para as amostras de fígado e ovo, ambas foram trituradas e homogeneizadas por 10 minutos, com o uso de um processador (Mixer RI 1364/09 Mini Processador 400W). Em seguida, pesou-se 20 g dessa mistura que foi então agitada com o uso de um processador com 40 mL de acetonitrila por 10 minutos. A mistura foi então transferida para tubos de polietileno de 30 mL e submetida a extração ELL-PBT da mesma forma descrita anteriormente para as amostras de leite.

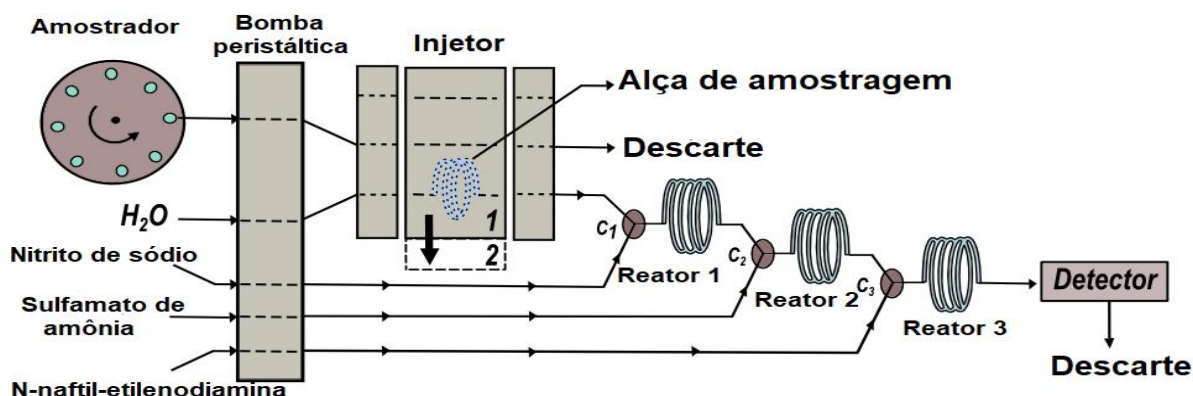
#### 4.5 Determinação de Sulfaguanidina Sódica em Sistema FIA

Inicialmente, efetuou-se uma varredura de 400 a 800 nm, com o intuito de obter o espectro de absorção molecular da sulfaguanidina. Esse estudo foi realizado usando soluções de nitrito de sódio 0,1 % (m/v), sulfamato de amônio 0,5 % (m/v), N-naftiletilenodiamina 0,1 % (m/v) e solução de sulfaguanidina sódica na concentração de 0,01 % (m/v) em meio HCl 0,18 mol L<sup>-1</sup> (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Através de um autoamostrador, uma alíquota da amostra foi inserida no fluxo transportador (Figura 22), através de um injetor proporcional. A adição dos reagentes ocorreu por confluência. O primeiro reagente foi o nitrito de sódio, adicionado no ponto C<sub>1</sub> logo após o injetor, permitindo que cada fração da amostra receba porções iguais desse reagente. No percurso analítico, foi instalada uma bobina R<sub>1</sub> para propiciar a mistura entre reagente e amostra. No ponto C<sub>2</sub> foi feita a introdução do sulfamato de amônio, o qual reage com a zona de amostra, posteriormente encaminhada para o reator R<sub>2</sub>. O terceiro reagente adicionado foi o N-naftiletilenodiamina, entrando na confluência C<sub>3</sub>. Imediatamente antes do detector, se instalou o reator R<sub>3</sub>, gerando, assim, um composto colorido (diazocomposto), detectado em 545 nm.

Todo o processo foi controlado por um computador através de software escrito em linguagem Visual Basic® (FIGUEIREDO *et al.*, 2006).

Figura 22: Diagrama esquemático do sistema de análise em fluxo para determinação de sulfaguanidina sódica

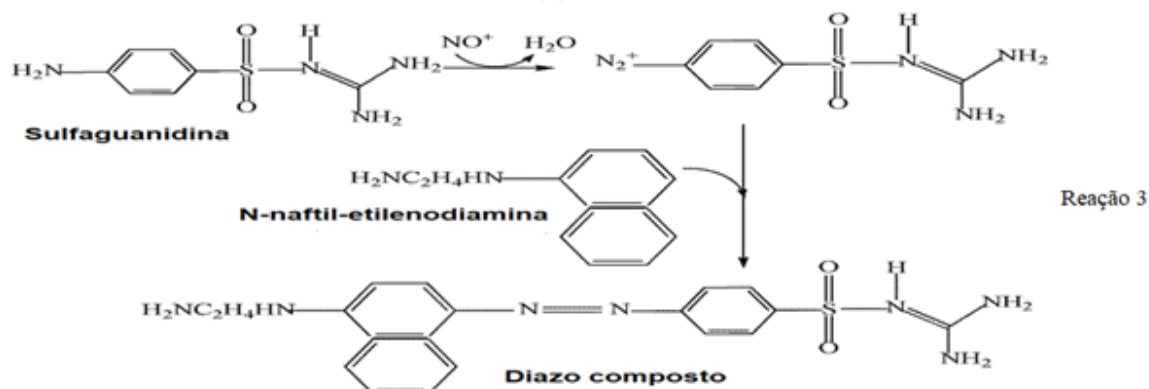
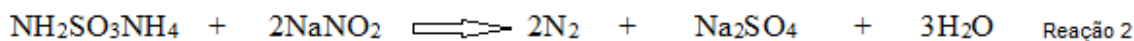
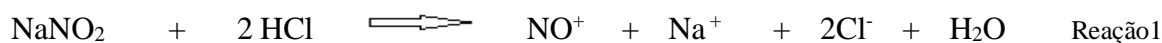


Fonte: O autor (2015)

O sistema FIA operou com as seguintes variáveis: Fluxo transportador (água) com vazão de  $7,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; R<sub>1</sub> solução de reagente de nitrito de sódio  $0,1\%$  (m/v), com vazão de  $4,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; R<sub>2</sub> solução de reagente de sulfamato de amônio  $1,98\%$  (m/v) com vazão de  $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; R<sub>3</sub> solução de reagente de N-naftiletlenodiamina  $0,26\%$  (m/v) com vazão de  $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; soluções padrão ou amostra (alça de amostragem de  $300 \text{ cm}$  / volume de  $1,62 \text{ mL}$ ), com vazão de  $4,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; B<sub>1</sub> bobina reacional ( $200 \text{ cm}$ ); B<sub>2</sub> bobina reacional ( $350 \text{ cm}$ ); B<sub>3</sub> bobina reacional ( $300 \text{ cm}$ ); E espectrofotômetro ( $545 \text{ nm}$ ) e D descarte. Os três reatores foram submetidos a uma temperatura de  $60^\circ\text{C}$  em banho de aquecimento em todas as etapas de otimização e aplicação em amostras.

No sistema de análise em fluxo, quando a amostra em meio ácido (HCl) é inserida de forma automatizada no sistema, recebe o primeiro reagente, nitrito de sódio, que em contato com o HCl presente no meio, libera o  $\text{NO}^+$  (Reação 1, Figura 23), que, reagindo com a sulfaguanidina presente na amostra, forma um composto intermediário (sal de diazônio), conforme mostrado na Reação 3. Após, a amostra é transportada no sistema, no qual a confluência C<sub>2</sub> recebe o sulfamato de amônio, reagente necessário no meio reacional para eliminar o excesso de nitrito de sódio presente (Reação 2), concentrações elevadas do nitrito de sódio que não reagiu com a amostra, gera  $\text{N}_{2(\text{g})}$  e ocasiona a presença de bolhas no sistema, interferindo no sinal analítico. Posteriormente, a amostra passa no reator R<sub>2</sub>, em seguida recebe o reagente N-afiltelenodiamina (Reação 3). Nessa parte do percurso analítico, a amostra é convertida em um diazo composto de coloração vinho no reator R<sub>3</sub>, detectado no espectrofotômetro em  $545 \text{ nm}$ .

Figura 23: Reações químicas que ocorrem ao longo do percurso analítico no sistema FIA para a determinação de sulfaguanidina sódica



Fonte: Adaptado de Adaptado de Allinger (1978)

#### 4.5.1 Procedimentos de otimização

Neste tópico estão descritos, detalhadamente, os procedimentos de otimização e a definição das condições experimentais para o desenvolvimento do método *on-line* para a determinação de sulfaguanidina sódica.

##### 4.5.1.1 Otimização das condições experimentais

De acordo com a literatura, sabe-se que as reações entre N-naftiletenodiamina e aminas (e.g. sulfaguanidina sódica) ocorrem normalmente em presença de ácido clorídrico diluído ou ácido acético concentrado. Dessa forma, sete variáveis foram estudadas. Para isso, elaborou-se um planejamento fatorial fracionado  $2^{7-2}$ , com o intuito de saber quais dessas variáveis influenciam na resposta do sistema. As variáveis analisadas neste planejamento inicial, com os respectivos níveis estudados, e a matriz experimental, estão apresentadas na

Tabela 5. Foram necessários 32 conjuntos de experimentos executados de forma aleatória e em triplicata.

Nos estudos de otimização foi utilizada solução padrão de a sulfaguanidina sódica. Nesse planejamento, as variáveis concentração de nitrito de sódio, sulfamato de amônio, N-naftiletlenodiamina, efeito do comprimento dos reatores R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub> e da alça de amostragem, foram avaliadas em dois níveis e codificadas: superior (+1) e inferior (-1).

Os dados experimentais foram processados no programa STATISTICA 7.0 (*Statsoft*, Tulsa USA), estabelecendo significância estatística com nível de confiança aleatória 95 %. A Tabela 5 apresenta os níveis estudados para cada variável. Os fatores mais significativos foram avaliados pelo gráfico de Pareto e, posteriormente, otimizados, usando a Matriz de Doehlert.

Tabela 5: Níveis dos fatores no planejamento Fatorial Fracionário  $2^{7-2}$

Variáveis	Níveis	
	inferior (-)	superior (+)
Nitrito de sódio (% m/v)	0.05	0.15
Sulfamato de amônio (% m/v)	0.25	0.75
N-naftil etilenodiamina (% m/v)	0.05	0.15
Alça de amostragem (cm)	125	350
Reator 1 (cm)	200	400
Reator 2 (cm)	250	450
Reator 3 (cm)	300	500

Exp.	Nitrito de sódio	Sulfamato de amônio	N-naftil etilenodiamina	Alça de amostragem	Reator 1	Reator 2	Reator 3
1	-	-	-	-	-	-	+
2	+	-	-	-	-	+	-
3	-	+	-	-	-	+	-
4	+	+	-	-	-	-	+
5	-	-	+	-	-	+	-
6	+	-	+	-	-	-	+
7	-	+	+	-	-	-	+

Exp.	Nitrito de sódio	Sulfamato de amônio	N-naftil etilenodiamina	Alça de amostragem	Reator 1	Reator 2	Reator 3
8	+	+	+	-	-	+	-
9	-	-	-	+	-	+	-
10	+	-	-	+	-	-	+
11	-	+	-	+	-	-	+
12	+	+	-	+	-	+	-
13	-	-	+	+	-	-	+
14	+	-	+	+	-	+	-
15	-	+	+	+	-	+	-
16	+	+	+	+	-	-	+
17	-	-	-	-	+	+	+
18	+	-	-	-	+	-	-
19	-	+	-	-	+	-	-
20	+	+	-	-	+	+	+
21	-	-	+	-	+	-	-
22	+	-	+	-	+	+	+
23	-	+	+	-	+	+	+
24	+	+	+	-	+	-	-
25	-	-	-	+	+	-	-
26	+	-	-	+	+	+	+
27	-	+	-	+	+	+	+
28	+	+	-	+	+	-	-
29	-	-	+	+	+	+	+
30	+	-	+	+	+	-	-
31	-	+	+	+	+	-	-

Exp.	Nitrito de sódio	Sulfamato de amônio	N-naftil etilenodiamina	Alça de amostragem	Reator 1	Reator 2	Reator 3
32	+	+	+	+	+	+	+

Experimento realizado com 5,5 mg L<sup>-1</sup> de sulfaguanidina sódica

Fonte: Barros Neto Scarminio e Bruns (1996)

#### 4.5.1.2 Planejamento Matriz de Doehlert

Após a triagem utilizando o planejamento fatorial fracionado 2<sup>7-2</sup>, verificou-se que cinco das sete variáveis apresentaram efeitos significativos. Essas foram selecionados para a etapa de otimização. Para as três, consideradas as mais significativas (nitrito de sódio, sulfamato de amônio e N-naftiletilenodiamina), foi utilizado um Planejamento Matriz de Doehlert. O planejamento é mostrado na Tabela 6, para as variáveis, alça de amostragem e Reator R1, que apresentaram os menores efeitos significativos, onde foi utilizada a otimização univariada. A concentração de sulfaguanidina sódica utilizada nesses planejamentos foi de 5,5 mg L<sup>-1</sup>

Tabela 6: Níveis codificados e reais da Matriz de Doehlert para três fatores

Fatores	Níveis Codificados e Reais						
Nitrito de sódio	-0,817	0	+0,817				
% (m/v)	(0,05)	(0,10)	(0,15)				
Sulfamato de	-1	-0,5	0	+0,5	+1		
Amônio % (m/v)	(0,25)	(0,50)	(0,75)	(1,25)	(1,50)		
N-naftil	-0,866	-0,577	-0,288	0	+0,288	+0,577	+0,866
% (m/v)	(0,09)	(0,11)	(0,13)	(0,15)	(0,17)	(0,19)	(0,21)

Experimento	Sulfamato de amônio	N-naftiletilenodiamina	Nitrito de sódio
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	1	0	0
5	0.5	0.866	0
6	0.5	0.289	0.817
7	-1	0	0
8	-0.5	-0.866	0

Experimento	Sulfamato de amônio	N-naftiletilenodiamina	Nitrito de sódio
9	-0.5	-0.289	-0.817
10	0.5	-0.866	0
11	0.5	-0.289	-0.817
12	-0.5	0.866	0
13	0	0.577	-0.817
14	-0.5	0.289	0.817
15	0	-0.577	0.817

Fonte: Barros Neto, Scarminio e Bruns (1996)

## 4.6 Figuras de Mérito

Nesta etapa, está descrita a faixa linear de resposta, a frequência analítica do método desenvolvido, a frequência de leitura dos padrões e amostras, além dos limites de detecção e quantificação.

### 4.6.1 Faixa de resposta e linearidade

A Faixa de resposta linear consiste do intervalo de aplicação de um método analítico, podendo ser definida como a região da curva analítica compreendida entre a menor concentração, na qual é possível medir determinada espécie quantitativamente (Limite de Quantificação, LQ), até a concentração na qual a curva analítica se desvia da linearidade (SKOOG; WEST; HOLLER, 1996).

A linearidade consiste na verificação estatística do quanto os valores experimentais, obtidos na faixa de resposta linear, se ajustam a uma reta. O valor numérico da linearidade é expresso pelo coeficiente de determinação ( $r$ ) (ANVISA, 2003). A curva analítica foi construída utilizando uma alça de amostragem com 1,62 mL para a injeção de padrões de sulfaguanidina sódica nas concentrações de: 0,03 mg L<sup>-1</sup>; 0,05 mg L<sup>-1</sup>; 1,00 mg L<sup>-1</sup>; 2,00 mg L<sup>-1</sup>; 3,00 mg L<sup>-1</sup>; 5,00 mg L<sup>-1</sup>; 7,00 mg L<sup>-1</sup>; 9,00 mg L<sup>-1</sup>, preparados em meio HCl 0,18 mol L<sup>-1</sup>.

#### 4.6.2 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Segundo a IUPAC (International Union Pure and Applied Chemistry), matematicamente, os cálculos referentes ao limite de detecção e quantificação consistem na razão entre o desvio padrão obtido de dez leituras do branco ( $S_{br}$ ) e o coeficiente angular da equação da curva analítica ( $b$ ). Multiplicando-se o valor obtido por três, obtém-se o LD (Equação 1) e multiplicando-se por dez o LQ (Equação 2) (INGLE JÚNIOR; CROUCH, 1988).

$$LD = \frac{3 S_{br}}{b} \quad \text{Equação 1}$$

$$LQ = \frac{10 S_{br}}{b} \quad \text{Equação 2}$$

#### 4.6.3 Frequência de Leitura (FL)

A frequência de leitura corresponde ao número de leituras que podem ser realizadas por intervalo de tempo, considerando também o tempo de limpeza inerente ao sistema FIA (CALATAYUD, 1995). No presente trabalho, para melhores resultados, e em função do tamanho da alça de amostragem, o tempo estabelecido para o enchimento da alça de amostragem foi de 50 segundos e o tempo de leitura e limpeza do sistema de 70 segundos, perfazendo, assim, 30 leituras por hora.

### 4.7 Estudos de Interferentes

Para avaliar as possíveis interferências, no método FIA desenvolvido foi realizado um levantamento na formulação de cada amostra. Esse estudo foi dividido em quatro grupos, conforme constituição de cada uma das amostras testadas.

Uma vez que as formulações farmacêuticas e as amostras de alimentos normalmente apresentam uma variedade de substâncias em sua composição, fez-se a opção por avaliar o efeito de grupos de possíveis interferentes de maneira simultânea, numa tentativa de simular, de forma mais fiel, os sistemas reais. Para esse estudo, também foi utilizada a análise

multivariada, baseada em planejamentos fatoriais fracionários. Para facilitar a aplicação das matrizes de planejamento, os concomitantes foram divididos em quatro grupos e as concentrações de cada constituinte (interferentes) foi estabelecida para os níveis, conforme encontrados em cada amostra. (Tabela 7).

Tabela 7: Grupos e Planejamento Fatoriais dos interferentes

<b>Grupo</b>	<b>Planejamento Fatorial</b>	<b>Interferentes</b>
A	2 <sup>3</sup>	enxofre, neomicina e caulín;
B	2 <sup>4</sup>	amido, CaCO <sub>3</sub> , celulose e lactose;
C	2 <sup>3</sup>	albumina, ácido láctico e caseína;
D	2 <sup>7-2</sup>	ampicilina, norfloxacino, flunixin meglumine, penicilina G procaína, trimetoprim, penicilina potássica e estreptomicina;

Fonte: Autor (2016)

Nesse estudo, soluções individuais contendo sulfaguanidina sódica, na concentração de 5,5 mg L<sup>-1</sup>, juntamente com os excipientes presentes em dois níveis de concentração, foram submetidas à agitação magnética por 15 minutos e, na sequência, sonicados por 15 minutos. Essas soluções foram então filtradas em papel de filtro quantitativo (Whatman, 41), posteriormente transferidas para balões volumétricos de 100 mL e completado o volume com água de Milli-Q. Antes de serem analisadas, pelo método FIA e por HPLC, as amostras novamente foram filtradas em membranas de nylon PTFE de 0,22 µm. As Tabelas 8 a 11 mostram os planejamentos fatoriais fracionários com cada grupo de interferentes.

Tabela 8: Grupo A: Planejamento Fatorial Fracionário 2<sup>3</sup> - Concentração dos interferentes

<b>Níveis</b>	<b><sup>a</sup> Enxofre % (m/v)</b>	<b>Sulfato de neomicina % (m/v)</b>	<b>Caulín % (m/v)</b>
-1	2,5	0,20	2,0
1	5,0	0,40	4,0

Fonte: O autor (2015)

Tabela 9: Grupo B: Planejamento Fatorial Fracionário  $2^4$  - Concentração dos interferentes

Níveis	Amido% (m/v)	CaCO <sub>3</sub> % (m/v)	Celulose % (m/v)	Lactose % (m/v)
-1	3,0	2,5	2,0	2,5
+1	6,0	5,0	4,0	5,0

Fonte: O autor (2015)

Tabela 10: Grupo C: Planejamento Fatorial Fracionário  $2^3$  - Concentração dos interferentes

Níveis	Albumina bovina % (m/v)	Ácido Lático % (m/v)	Caseína % (m/v)
-1	20,0	0,18	0,08
+1	40,0	0,36	0,16

Fonte: O autor (2015)

Tabela 11: Grupo D: Planejamento Fatorial Fracionário  $2^{7-2}$  - Concentração dos interferentes

Níveis	Ampicilina ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Norfloxacino ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Flunixin ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Penicilina G procaína ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Trimeto prima ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Penicilina G potássica ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Estrepto micina ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
-	50,0	10,0	125,0	100,0	100,0	250,0	100,0
+	100,0	20,0	250,0	200,0	200,0	500,0	200,0

Fonte: O autor (2015)

A resposta para cada experimento foi a porcentagem de interferência, ao se comparar uma solução contendo somente o analito com as soluções contendo além do analito os demais concomitantes. Para os grupos A, B e C foi usada uma solução com  $5,5 \text{ mg L}^{-1}$  de sulfaguanidina sódica e para o grupo D,  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . De posse dessas porcentagens, calculou-se as estimativas de contraste que foram plotadas em um gráfico de probabilidade.

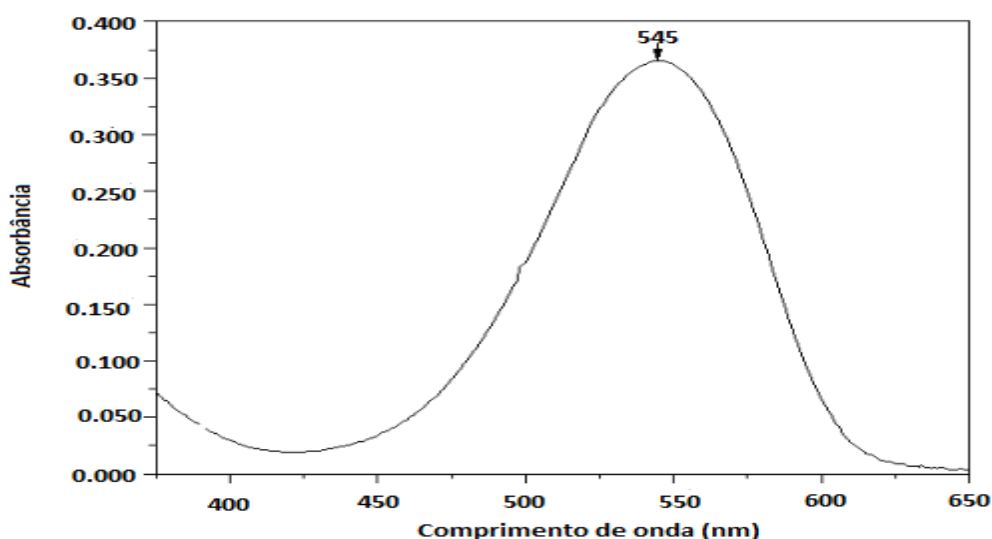
#### 4.8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussões deste trabalho são apresentados a seguir e são referentes às etapas de otimização e aplicação do método em amostras.

#### 4.8.1 Estudos Preliminares

Foi realizada uma varredura espectral (Figura 24), utilizando uma solução contendo 0,01% (m/v) de sulfaguanidina sódica, com solução de nitrito de sódio 0,1% (m/v), sulfamato de amônio 0,5% (m/v), solução de N-naftiletilenodiamina 0,1% (m/v) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). O espectro obtido mostrou uma maior absorbância em 545 nm, não sendo detectada interferência provenientes dos próprios reagentes. Esse valor foi condizente com o obtido em outros trabalhos (COUTO; RAMOS; CAVALHEIRO, 1998). Assim, os experimentos referentes ao desenvolvimento do sistema FIA foram realizados nesse comprimento de onda.

Figura 24: Varredura espectral do composto obtido a partir da reação com uma solução de sulfaguanidina sódica na concentração de 0,01% (m/v)



Fonte: O autor (2016)

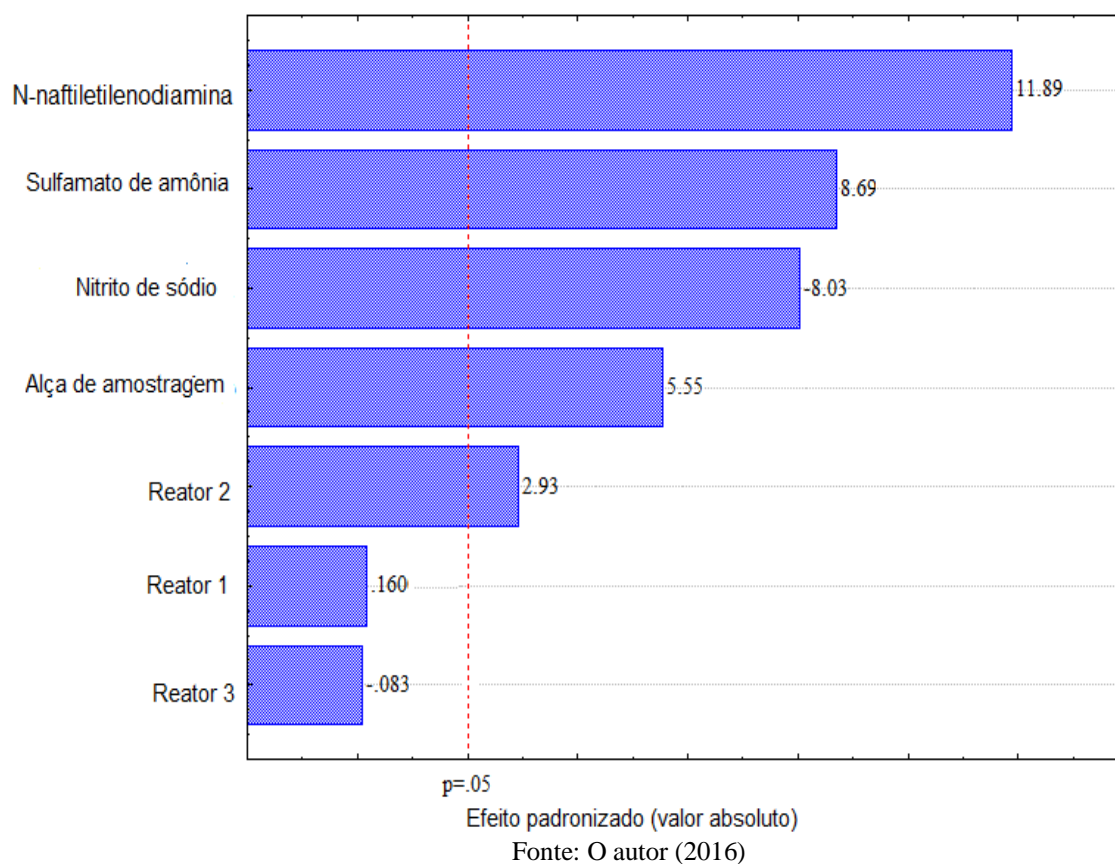
#### 4.8.2 Otimização multivariada do método on-line desenvolvido

Para a otimização do método, as variáveis nitrito de sódio, sulfamato de amônio, N-naftiletilenodiamina, alça de amostragem, reatores  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$  foram avaliadas por meio de um planejamento fatorial fracionário ( $2^{7-2}$ ).

A Figura 25 mostra o Gráfico de Pareto, representando os efeitos estimados e obtidos pelo tratamento estatístico dos resultados apresentados na Tabela 5, utilizando o programa Statistic®. As barras horizontais, maiores que a linha vertical dada por  $p = 0,05$ , representam a significância dos fatores. A linha tracejada corresponde ao efeito mínimo que uma variável

ou interação entre elas, deve produzir para causar variação significativa no sinal analítico, com uma confiança de 95 %.

Figura 25: Diagrama de Pareto para as variáveis estudadas. Nível de confiança de 95%



Através da Figura 25, é possível verificar que de todos os sete fatores estudados, somente os reatores  $R_1$  e o  $R_3$  não apresentaram efeitos significativos no intervalo avaliado. Dessa forma, seus valores foram mantidos nos seus menores níveis de comprimentos, 200 cm e 300 cm, respectivamente.

A variável mais importante, dentro das condições estudadas, foi o reagente cromogênico N-naftil-etilenodiamina (11,90), indicando que o aumento da concentração de 0,05% para 0,15% (m/v) favorece a reação química. Esse fato pode ser explicado pelo deslocamento do equilíbrio para a formação do diazo composto da reação do sal de diazônio com o N-naftiletilenodiamina, formando um complexo que é responsável pelo aumento na absorvância. Essa variável foi ajustada ao nível alto (+1), o qual corresponde aos valores de concentração acima de 0,15% (m/v).

O reagente sulfamato de amônio também apresentou estimativa de contraste positivo (8,70), indicando que o intervalo de concentração entre 0,25% e 0,75% (m/v), desse reagente,

contribuiu para o aumento do sinal analítico. Nessa reação envolvendo o sulfamato de amônio, o nitrito de sódio é transformado em íons nitrônio ( $\text{NO}^+$ ), na presença de ácido clorídrico contido na amostra e através de um ataque eletrofílico por parte desse íon nitrônio ao grupo amino da sulfaguanidina, forma o sal de diazônio, servindo de partida para a reação com o N - afitiletilenodiamina. De acordo com Mirvish (1975); Archer, Tannenbaum e Wishnok (1976), o sulfamato de amônio é responsável por eliminar o excesso do íon nitrônio remanescente, que não foi consumido pela amostra de sulfaguanidina sódica. No meio reacional, o excesso de nitrito de sódio, é convertido em  $\text{N}_2$  (g), causando o aparecimento de bolhas no percurso, interferindo no sinal analítico.

O nitrito de sódio, outra variável estudada, apresentou efeito significativo negativo, (- 8,03), para esse estudo. A variável foi ajustada para níveis inferiores à concentração de 0,15% (m/v), confirmando as informações acima, de que seu excesso no meio interfere no sinal analítico da reação.

Quanto à alça de amostragem (AA) foi observado um efeito positivo, indicando que o melhor sinal ocorre com o maior comprimento desse dispositivo, pois, com o aumento desse parâmetro, tem-se uma menor dispersão no centro da zona de amostra no percurso, propiciando melhor sinal analítico.

Uma estimativa de contraste positiva também foi verificada para o  $R_2$ . Observa-se que quando se aumenta o comprimento da bobina reacional (250 cm para 450 cm), tem-se um aumento no sinal analítico, que pode ser notado pelo efeito positivo (2.93). Isso sugere que a cinética de oxidação do nitrito na presença de sulfamato de amônio, é lenta e é favorecida pelo aumento do comprimento do reactor.

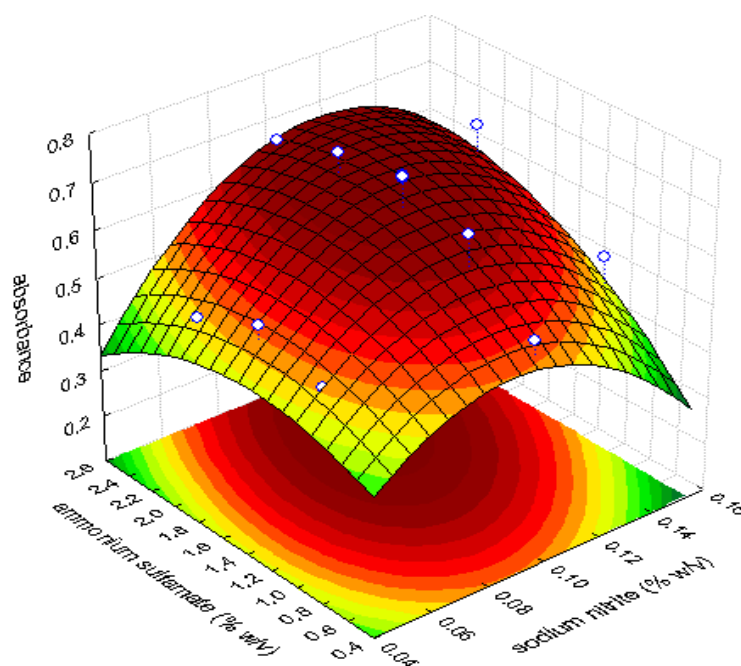
Como o comprimento dos reatores,  $R_1$  e  $R_3$  não apresentaram estimativas de contraste significativas, se fixou os mesmos em 200 e 300 cm, respectivamente, em seus menores níveis.

A otimização das concentrações ideais de N-naftiletilenodiamina, sulfamato de amônio e nitrito de sódio foi realizada através de planejamento da Matriz de Doehlert (Tabela 6) e os pontos de ótimo obtidos pela metodologia de superfície de resposta (Figura 26).

#### 4.8.3 Planejamento Matriz de Doehlert para a determinação de Sulfaguanidina Sódica

De posse da significância estatística dos fatores investigados no planejamento fatorial fracionário  $2^{7-2}$ , foi realizado um planejamento Matriz de Doehlert para três fatores, reagente 1 (nitrito de sódio), reagente 2 (sulfamato de amônio) e reagente R<sub>3</sub> (N-naftiletilenodiamina). As Figuras 26A, 26B e 26C mostram as superfícies de resposta dos conjuntos de experimentos.

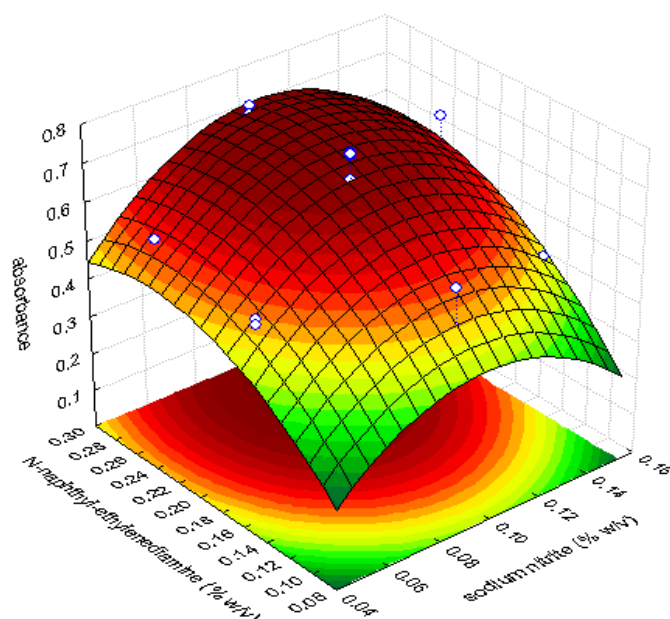
Figura 26: A) Superfície de Resposta: sulfamato de amônio x Nitrito de sódio



Fonte: O autor (2016)

A Figura 26 A mostra a superfície de resposta para as variáveis de concentração da solução de sulfamato de amônio em função da concentração de nitrito de sódio. É possível observar que existe um valor máximo dentro do domínio experimental utilizado. Na superfície de resposta, pode-se verificar que em concentrações maiores, bem como em menores de nitrito de sódio, tem-se uma diminuição no sinal analítico. Isso pode ser explicado, uma vez que, em concentrações menores, ocorre uma menor formação do íon nitrônio, que está diretamente relacionado com a formação do sal de diazônio, por outro lado, o excesso desse sal no meio forma  $N_{2(g)}$ , interferindo no sinal analítico por formação de bolhas no percurso analítico. O ponto ótimo para esses dois reagentes foram: 2,0% (m/v) para a concentração de sulfamato de amônio e 0,1% (m/v) para a solução de nitrito de sódio.

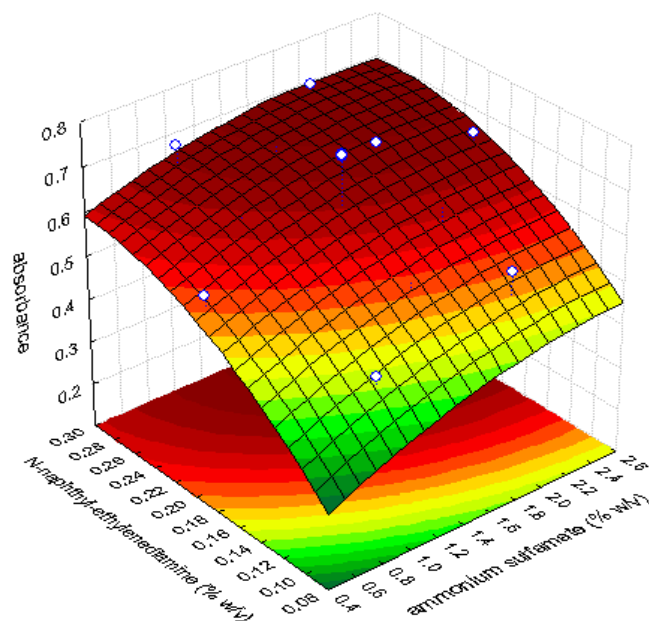
Figura 26: B) N-naftil-etilenodiamina x nitrito de sódio



Fonte: O autor (2016)

A figura 26 B ilustra a região ótima para a determinação de sulfaguanidina sódica em função da concentração da solução de nitrito de sódio e a concentração da solução N-naftil-etilenodiamina. Observa-se que, no ponto de ótimo, os valores foram de 0,1% (m/v) para a solução de nitrito de sódio e 0,28 % (m/v) para a solução de N-naftiletilenodiamina. A superfície de resposta mostra que concentrações maiores de N-naftiletilenodiamina, contribuem para o aumento do sinal analítico, favorecendo o deslocamento do equilíbrio para a formação do diazo composto. Novamente, é observado na superfície que, para valores menores e maiores que 0,1 % (m/v) de nitrito de sódio, o sinal analítico é afetado, mostrando assim, a relação que este reagente apresenta no meio reacional como já observado na superfície 26 A.

Figura 26: C) N-naftietilenodiamina x sulfamato de amônio



Fonte: O autor (2016)

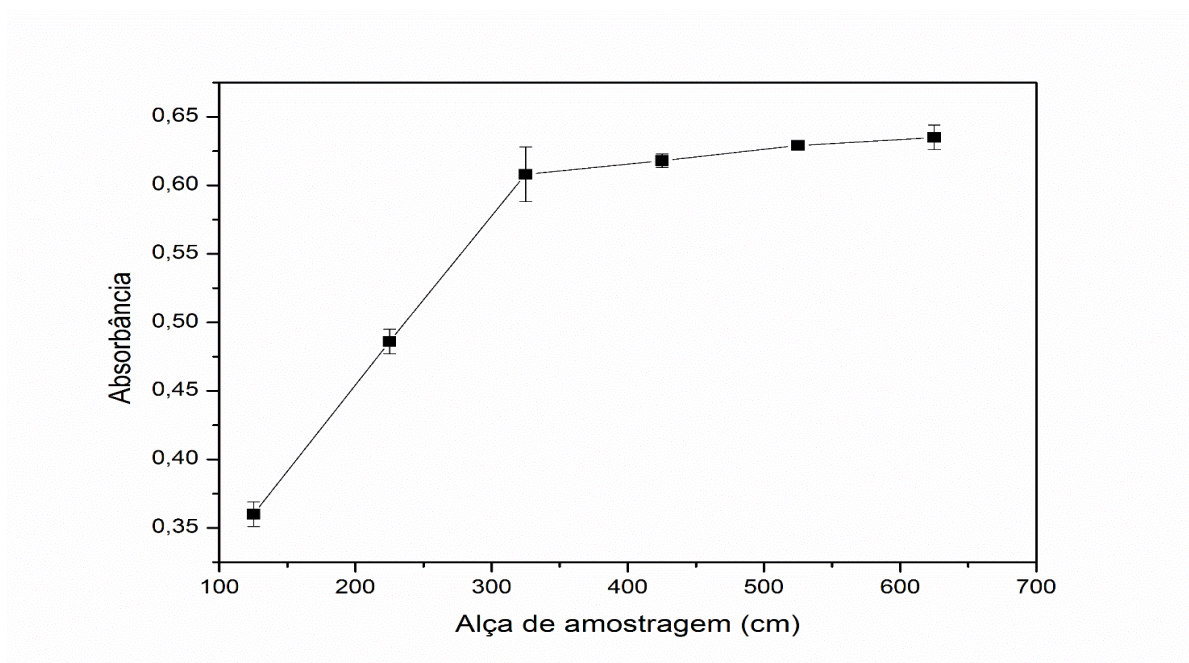
A Figura 26 C mostra a superfície de resposta construída entre os fatores N-naftietilenodiamina e o sulfamato de amônio. Como pode ser observado, existe um valor máximo dentro do domínio experimental utilizado e um aumento do sinal analítico com o aumento da concentração de ambos os reagentes. Isso pode ser justificado pelo fato de que, com a maior concentração de sulfamato de amônio, melhor será controlada a formação do íon nitrônio, que é responsável diretamente pela formação do diazo composto. Os pontos críticos foram 2,0% (m/v) para a solução de sulfamato de amônio e 0,28% (m/v) para a solução de N-naftietilenodiamina.

#### 4.8.4 Efeito da Alça de Amostragem e do Reator R<sub>2</sub> sobre o Sinal Analítico

A Figura 27 apresenta o efeito do tamanho da alça de amostragem sobre a absorvância. Para este estudo, variou-se o comprimento da alça de amostragem de 125 cm até 625 cm, com incrementos de 100 cm. Nota-se pela Figura 27, que o sinal analítico aumenta com o tamanho da alça de amostragem até 325 cm, em seguida, a absorvância tende a se manter constante. Isso pode ser explicado pelo fato de que as alças de comprimento maiores, mantêm a zona central de amostra mais equidistante das zonas frontal e de calda, sendo menos influenciada

pelos fenômenos de dispersão e diluição que acontecem no percurso analítico. Dessa forma, o comprimento de 325 cm (1,64 mL) foi adotado para todos os experimentos.

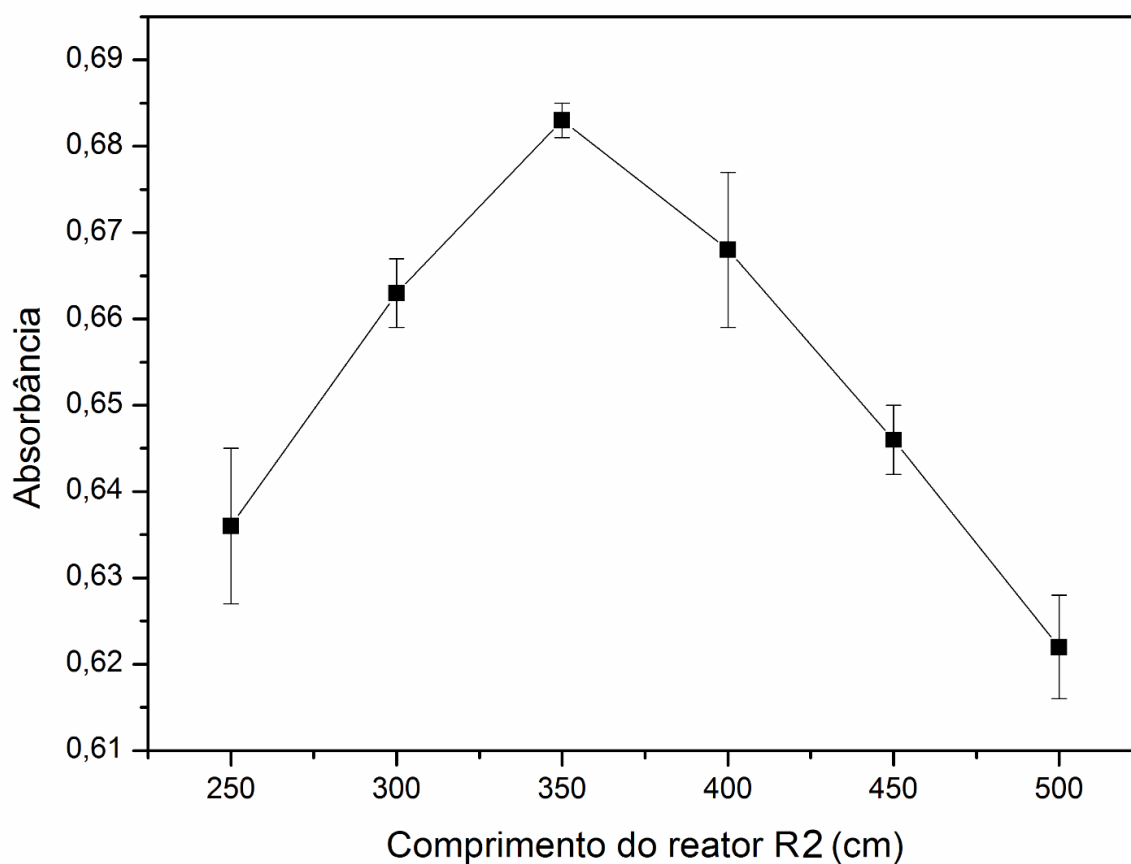
Figura 27: Efeito do tamanho da alça de amostragem sobre a absorbância. Experimento realizado com  $5,5 \text{ mg L}^{-1}$  de sulfaguanidina sódica



Fonte: O autor (2016)

Como visto no gráfico de Pareto, o tamanho do reator 2 também influencia a resposta analítica. A Figura 28 relaciona o comprimento do reator 2 (cm) com a absorbância. Nota-se que o sinal analítico aumenta com o tamanho do reator 2 até o comprimento de 350 cm, o que pode ser explicado pela lenta cinética da reação de formação do sal de diazônio. Após 350 cm, a absorbância decai, provavelmente, devido à dispersão e diluição da zona de amostra no percurso analítico. Dessa forma, o comprimento de 350 cm foi fixado para esse reator.

Figura 28: Influência do comprimento do Reator 2 na absorbância - Experimento realizado com  $5,5 \text{ mg L}^{-1}$  de sulfaguanidina sódica



Fonte: O autor (2016)

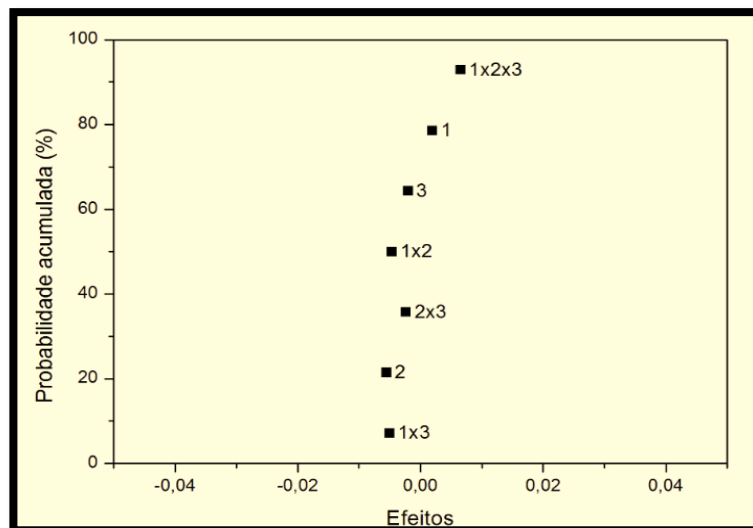
#### 4.8.5 Análise Multivariada de Interferentes no Sistema FIA

As Figuras 29 A, 29 B, 29 C e 29 D mostram os gráficos de probabilidade acumulada para as quatro classes de concomitantes. A interpretação dos gráficos revela que todos aqueles efeitos e contrastes de cada espécie interferente e interações que estão próximos de zero não são significativos (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1996;; TARLEY *et al.*, 2005).

É possível observar nas figuras que, para o estudo dos quatro grupos de interferentes, os efeitos principais e as interações de dois, de três e de quatro fatores, não apresentaram efeitos significativos no método, ou seja, quando estes concomitantes estiverem presentes no meio (amostra), não afetará a resposta analítica.

Figura 29 A: Probabilidade dos resultados obtidos com a aplicação das matrizes experimentais no estudo de interferentes para sulfaguanidina sódica no Planejamento Fatorial Fracionário  $2^3$ :

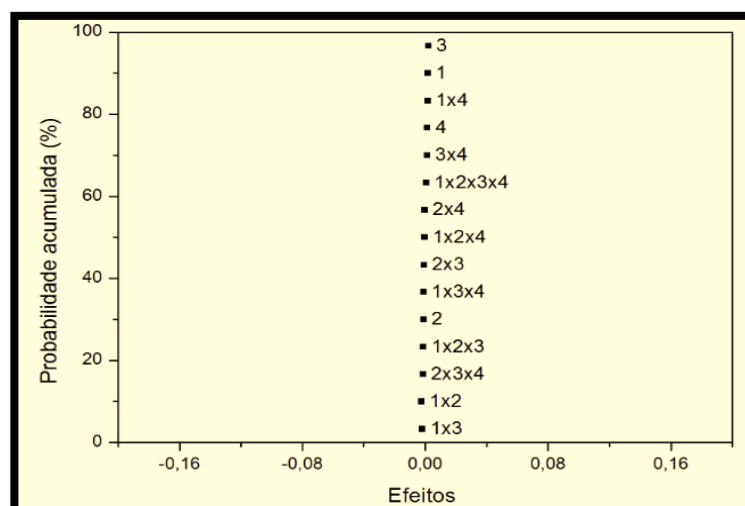
1- enxofre; 2- sulfato de neomicina e 3-caulin



Fonte: O autor (2016)

Figura 29 B: Probabilidade dos resultados obtidos com a aplicação das matrizes experimentais no estudo de interferentes para sulfaguanidina sódica no Planejamento Fatorial Fracionário  $2^4$ :

1-amido; 2-carbonato de cálcio; 3-celulose e 4-lactose

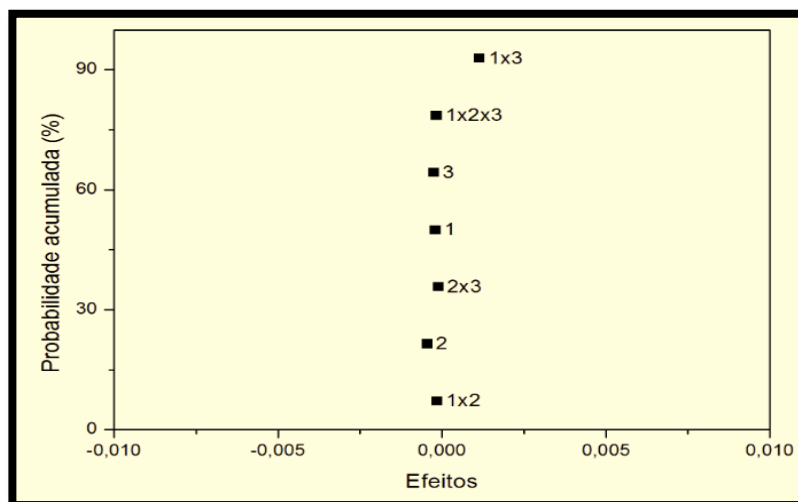


Fonte: O autor (2016)

Figura 29 C: Probabilidade dos resultados obtidos com a aplicação das matrizes experimentais no estudo de interferentes para sulfaguanidina sódica no Planejamento

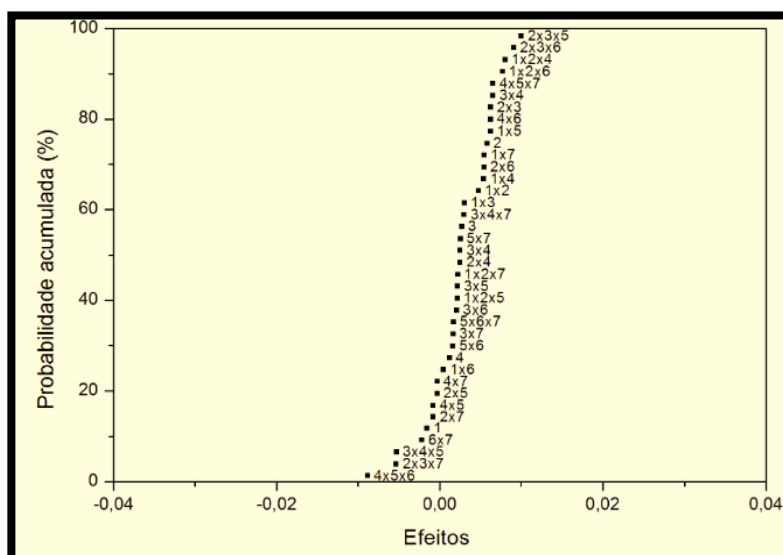
Fatorial Fracionário  $2^3$ :

1- albumina bovina; 2-ácido láctico e 3-caseína



Fonte: O autor (2016)

Figura 29 D: Probabilidade dos resultados obtidos com a aplicação das matrizes experimentais no estudo de interferentes para sulfaguanidina sódica no Planejamento Fatorial Fracionário  $2^{7-2}$ : 1-ampicilina; 2-norfloxacino; 3-flunixin; 4-penicilina G procaína; 5- trimetoprima; 6- penicilina G potássica e 7-estreptomicina

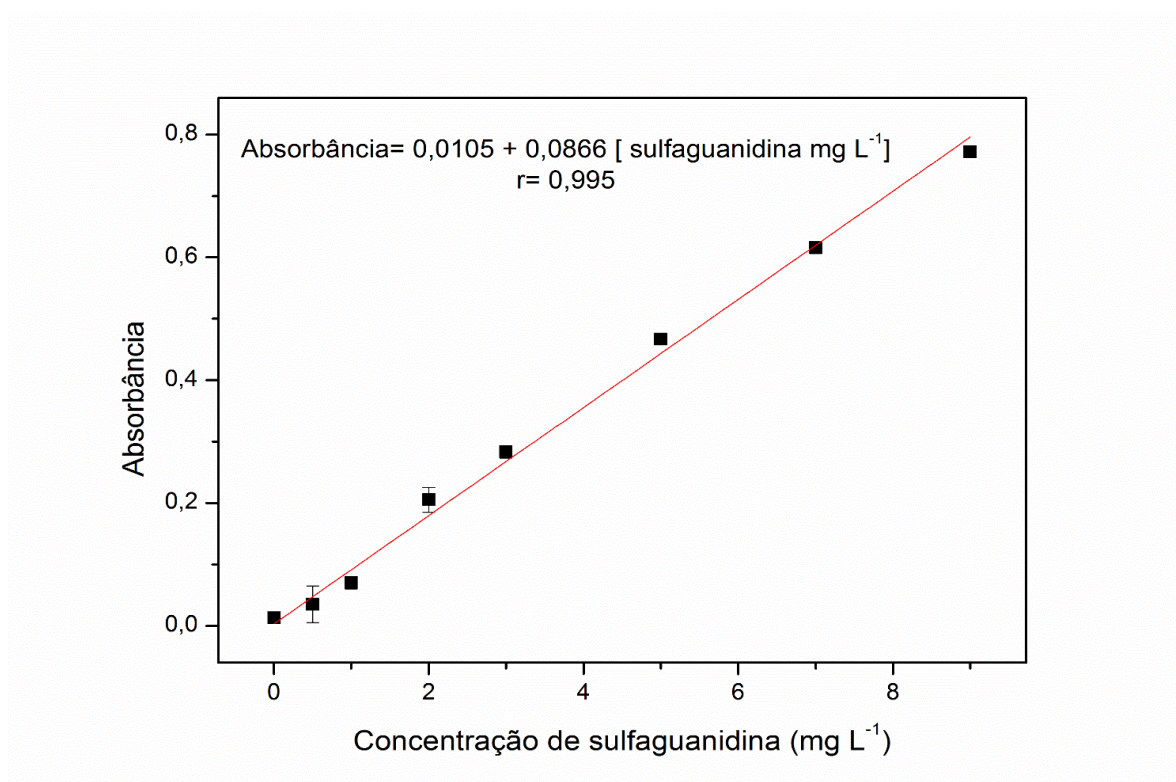


Fonte: O autor (2016)

#### 4.8.6 Figuras de Mérito e Aplicação em Amostras

A curva analítica (Figura 30) para a sulfaguanidina sódica com o método FIA proposto, apresentou a equação:  $Abs = 0,0105 + 0,0866 [sulfaguanidina (mg L^{-1})]$ , com coeficiente de correlação  $r = 0,995$ . O limite de detecção e limite de quantificação foi de  $0,012 mg L^{-1}$  e  $0,039 mg L^{-1}$ , respectivamente. A faixa linear de resposta foi de  $0,03 mg L^{-1}$  a  $9,0 mg L^{-1}$ . Todas as leituras dos padrões e das amostras foram realizadas em triplicatas e o Coeficiente de Variação foi inferior a 3,0%, o que indica uma boa precisão do método.

Figura 30: Curva analítica para a determinação de sulfaguanidina sódica com o sistema FIA proposto



Fonte: O autor (2016)

Para verificar a exatidão, o método proposto foi aplicado na determinação de sulfaguanidina sódica em formulações farmacêuticas de uso veterinário e em amostras de leite, ovo e fígado de frango. Os resultados obtidos foram comparados com o método de referência por CLAE. A Tabela 12 mostra os valores obtidos pela técnica FIA e por CLAE.

A exatidão do método foi avaliada em comparação com a técnica CLAE e os resultados foram condizentes (*teste-t* para comparação de médias, 95% de confiança). A precisão, avaliada pelo desvio padrão relativo, foi inferior a 4%.

Tabela 12: Aplicação do método validado para determinação de sulfaguanidina sódica em diferentes amostras

Amostras	<sup>a</sup> Método FIA	C.V. (%)	<sup>a</sup> CLAE	Erro (%)
<b>1</b>	5.50 ± 0.03	0,54	5.30 ± 0.01	3.77
<b>2</b>	5.97 ± 0.08	1,34	5.60 ± 0.06	6.61
<b>3</b>	5.10 ± 0.08	1,56	5.50 ± 0.05	-7.27
<b>4</b>	6.00 ± 0.07	1,16	5.73 ± 0.02	4.71
<b>5</b>	5.68 ± 0.06	1,58	5.97 ± 0.02	-4.86
<b>Ovos</b>	0.063 ± 0.001	1,58	0.062 ± 0.002	1.30
<b>Leite</b>	0.049 ± 0.002	4,00	0.048 ± 0.003	1.63
<b>Fígado de Frango</b>	0.056 ± 0.002	3,57	0.060 ± 0.001	-2.96

Resultados expressos como média ± SD ( $n=3$ ). <sup>a</sup>mg kg<sup>-1</sup>, teste t de dados pareados com 95% de confiança. Amostras de 1 a 5 são formulações farmacêuticas

Fonte: O autor (2016)

Ao relacionar o LQ do método proposto por sistema de análise em fluxo, que foi de 12 µg L<sup>-1</sup>, e comparado com os demais métodos mostrados na tabela 13, é possível verificar que o desempenho do método proposto é viável, podendo ser empregado para a determinação de resíduos dessa classe de antibióticos em alimentos, uma vez que a Instrução normativa n° 8, de 29 de abril de 2010, preconiza em 100 µg Kg<sup>-1</sup> dessa classe de antibióticos em alimentos.

Tabela 13: Comparação de diferentes métodos analíticos para a determinação de sulfonamidas em diferentes tipos de amostras

Detetor	Intervalo linear	LOD	Aplicação	Ref.
HPLC-UV	50-2000 mg kg <sup>-1</sup>	10 mg kg <sup>-1</sup>	Formulações farmacêuticas e alimentos	Pietroń <i>et al.</i> (2013)
TLC-HPTLC-silica gel F <sub>254</sub> plates		50 µg L <sup>-1</sup>	Águas residuais	Babić <i>et al.</i> (2006 a)
TLC-HPTLC-CN F <sub>254</sub> plates		200 µg L <sup>-1</sup>	Águas residuais	Babić <i>et al.</i> (2006b)
TLC-HPTLC-CN F <sub>254</sub> plates		50 µg L <sup>-1</sup>	Amostras de solo	Mutavdžić <i>et al.</i> (2014)
TCP/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GO HPLC-DAD	500-20000 µg L <sup>-1</sup>	200 µg L <sup>-1</sup>	Água de abastecimento	Shi; Ye, 2015
LC/MS/MS	20 -100 µg kg <sup>-1</sup>	11.8 µg kg <sup>-1</sup>	Mel de abelhas	Dubreil-Chéneau <i>et al.</i> (2014)
HPLC - DAD	1,29 – 7,9 ng mL <sup>-1</sup>	26,3 ng mL <sup>-1</sup>	Leite	Malik <i>et al.</i> (1994)

Detetor	Intervalo linear	LOD	Aplicação	Ref.
Espectrofotometria de absorção molecular na região do visível.	0.039 a 9 mg L <sup>-1</sup>	0.012 mg L <sup>-1</sup>	Formulações farmacêuticas e alimentos	Neste trabalho

DAD, Diode array detection; TCPP/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GO: type of porphyrin-functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-graphene oxide  
 Fonte: Autor (2016)

#### 4.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método FIA desenvolvido apresentou bons resultados e foi aplicado com êxito em diferentes matrizes, como amostras farmacêuticas, ovo, fígado de frango e leite bovino, mostrando boa precisão com RSD, inferior a 4%. O limite de detecção e quantificação foram, respectivamente, de 0,012 mg L<sup>-1</sup> e 0,039 mg L<sup>-1</sup>, permitindo a aplicação do método para o monitoramento de teores e controle de resíduos de sulfaguanidina sódica em amostras alimentícias, visto que esses limites estão abaixo do limite máximo recomendado pelos órgãos governamentais.

O sistema FIA proposto apresentou boa exatidão, quando comparado ao método padrão empregando CLAE e adicionalmente apresenta economia de reagentes, caracterizando-se como um método rápido com frequência de 30 leituras H<sup>-1</sup>, além de apresentar baixo custo e ser de fácil operação.

As figuras de mérito, tais como: faixa de resposta linear, linearidade, precisão e exatidão, ratificaram a viabilidade do método FIA, assim como excelente robustez, repetitividade e reprodutibilidade de eventos.

## **5 SISTEMA DE ANÁLISE EM FLUXO PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE ORGANOFOSFORADOS EM ALIMENTOS, USANDO PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM MATERIAL DE ACESSO RESTRITO COMPOSTO DE NANOTUBO DE CARBONO MAGNÉTICO REVESTIDO COM ALBUMINA BOVINA (M-RACNT).**

Neste tópico será descrita a metodologia detalhada utilizada neste trabalho.

### **5.1 Metodologia Experimental**

A metodologia experimental, apresentada abaixo, foi dividida em três partes:

- 1<sup>a</sup>) Desenvolvimento e Otimização do Sistema FIA, para determinação de organofosforados;
- 2<sup>a</sup>) Funcionalização dos nanotubos de carbono; desenvolvimento do material híbrido nanotubo de carbono magnético (MCNT); revestimento do MCNT com BSA (M-RACNT) e otimização da etapa de extração de organofosforados em amostras;
- 3<sup>a</sup>) Aplicação da metodologia em amostras de alimentos (berinjela, brócolis, couve-flor, leite de soja e vagem verde).

### **5.2 Reagentes e Soluções**

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada produzida em um sistema Milli-Q system (Millipore, EUA). As soluções de trabalho dos organofosforados e reagentes foram preparadas semanalmente. A solução estoque da mistura dos organofosforados clorpirifós, diazinon, malation, paration e metamidofós (Fluka) foi preparada na concentração de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ , pela dissolução de 20 mg de cada um dos 5 pesticidas em ácido acético  $7,5 \text{ mol L}^{-1}$ , quantitativamente transferida para um balão volumétrico de 100 mL. Essa solução foi acondicionada em vidro de cor âmbar e armazenada em geladeira ( $4^{\circ}\text{C}$ ).

Na otimização do sistema FIA, para os Planejamentos Fatorial Fracionário Multivariado e para o sistema Univariado, foi utilizada uma solução aquosa da mistura dos cinco organofosforados na concentração de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . partindo da diluição da solução estoque de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ . Para a construção da curva analítica, foram preparadas soluções da mistura dos cinco organofosforados nas concentrações de  $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $1000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $2000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ;

2500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; 4000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 6000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , todas em meio aquoso (ácido acético).

Na etapa de pré-concentração, para os Planejamentos Fatorial Fracionário e Matriz de Doehlert, foi preparada uma solução aquosa na concentração de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , partindo de uma solução estoque de 1000  $\text{mg L}^{-1}$  da mistura dos cinco organofosforados em dimetilformamida.

Para a construção da curva analítica na etapa de pré-concentração, foram preparadas soluções aquosas nas concentrações de 5,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; 15  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; 25  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; 40  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; 70  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 90  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Todas as soluções foram preparadas partindo da solução de concentração de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

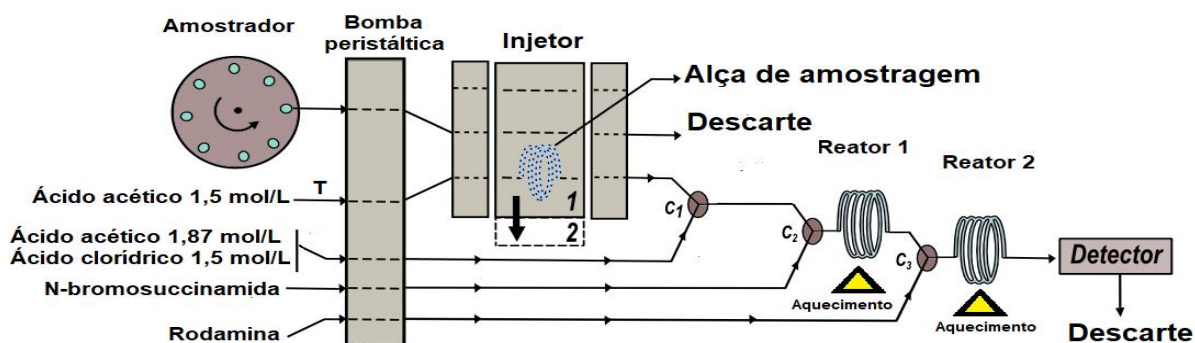
### 5.3 Determinação On-line de Organofosforados em Amostras Alimentícias

O diagrama esquemático do sistema de análise em fluxo para a determinação de organofosforado é mostrado na Figura 31A.

No sistema FIA, com o auxílio de um autoamostrador, uma alíquota da amostra é inserida no fluxo transportador (ácido acético 1,5  $\text{mol L}^{-1}$ ), através de um injetor comutador. Os reagentes foram adicionados através de confluências. O primeiro reagente, uma mistura de ácido acético 1,87  $\text{mol L}^{-1}$  e ácido clorídrico 1,5  $\text{mol L}^{-1}$  foi adicionado no ponto  $C_1$  logo após o injetor. A adição desse reagente é necessária para favorecer a reação de oxirredução da mistura dos organofosforados, que acontece no sistema FIA (MATHEW; PILLAI; GUPTA, 2007). Ainda no percurso analítico, no ponto  $C_2$ , é feita a adição da solução de N- bromosuccinamida na concentração de  $5,0 \times 10^{-3} \%$  (m/v), que oxida os organofosforados no reator  $R_1$  (Figura 31 B, Reação 4), o qual foi mantido em banho térmico na temperatura de 60°C. Posteriormente, a mistura reacional recebe na confluência  $C_3$  o reagente rodamina B, na concentração de  $2,0 \times 10^{-2} \%$  (m/v), e é conduzida ao reator  $R_2$ , também mantido em banho térmico na temperatura de 60°C. Nessa etapa (Figura 31 B, Reações 05 e 06), a sobra o  $\text{Br}_2$  liberado do NBS em meio ácido, oxida a rodamina B e a absorbância é medida em 560 nm.

Dessa forma, relaciona-se que quanto menor a concentração de organofosforados na amostra, maior será a concentração de NBS que restará no equilíbrio, podendo então, oxidar a rodamina B, diminuindo, desse modo, a intensidade da coloração desse reagente e, conseqüentemente, o sinal analítico. A absorbância da solução final é monitorada em 560 nm.

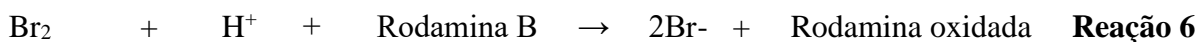
Figura 31: A – Diagrama esquemático do sistema de análise em fluxo otimizado para a determinação de organofosforado



Fonte: O autor (2017)

O sistema FIA operou com as seguintes variáveis: T solução transportadora (ácido acético  $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) com vazão de  $4,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; R<sub>1</sub> solução do reagente ácido acético  $1,87 \text{ mol L}^{-1}$  / ácido clorídrico  $1,5 \text{ mol L}^{-1}$  com vazão de  $8,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; R<sub>2</sub> solução do reagente N-bromosuccinamida  $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (m/v) com vazão de  $6,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; R<sub>3</sub> solução do reagente rodamina B  $2,0 \cdot 10^{-2} \%$  (m/v) com vazão de  $4,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; As soluções padrão ou amostra (alça de amostragem de  $95 \text{ cm}$  ( $0,48 \text{ mL}$ )), com vazão de  $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; B<sub>1</sub> bobina reacional ( $500 \text{ cm}$ ); B<sub>2</sub> bobina reacional ( $250 \text{ cm}$ ); E espectrofotômetro ( $560 \text{ nm}$ ) e D descarte.

Figura 31 B- Reação dos organofosforados com o NBS em meio ácido na presença da rodamina B



Fonte: Adaptado de Tiwari e Asthana (2012)

## 5.4 Procedimentos de Otimização do Sistema FIA para a Determinação de Organofosforados

Neste tópico está descrito o estudo das variáveis mais significativas que influenciam na reação química e as etapas de otimização do método FIA proposto.

### 5.4.1 Otimização do sistema FIA para detecção espectrofotométrica de organofosforados

O estudo das variáveis pertinentes ao sistema FIA de detecção espectrofotométrica foi realizado, primeiramente, por meio de um planejamento fatorial fracionário multivariado e, na sequência, por um planejamento univariado.

Para estudos de otimização, foi utilizada uma mistura dos organofosforados clorpirifós, Diazinon, Malation, Paration e Metamidofós. Nesse planejamento, as variáveis fluxo carregador, concentração de ácido acético / ácido clorídrico, N-bromosuccinamida, rodamina B e comprimento dos reatores ( $R_1$  e  $R_2$ ) foram avaliadas em dois níveis. As variáveis analisadas, nesse planejamento inicial, com os respectivos níveis estudados e a matriz experimental estão apresentadas na Tabela 14. Foram necessários 16 conjuntos de experimentos executados, de forma aleatória e em duplicata. Após a triagem, os fatores mais significativos foram avaliados pelo gráfico de Pareto.

O parâmetro utilizado como resposta analítica foi a altura do sinal transiente de absorvância. Os dados experimentais foram processados no programa STATISTICA 7.0 (*Statsoft*, Tulsa USA), estabelecendo significância estatística com nível de confiança aleatória de 95%.

Tabela 14: Níveis dos fatores no planejamento Fatorial Fracionário  $2^{6-2}$ , usando uma solução com a mistura dos organofosforados (clorpirifós, diazinon, malation, metamidofós e paration) na concentração final de  $50 \text{ mg L}^{-1}$

Sigla	Fator	Níveis	
		Mínimo ( - )	Máximo ( + )
NBS	N-bromosuccinamida % (m/v)	$5,0 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$
HAC/HCl	Ácido acético/ácido clorídrico ( $\text{mol L}^{-1}$ )	3,75 / 3,0	7,50 / 6,0
$R_1$	Reator reacional 1 (cm)	500	750
$R_2$	Reator reacional 2 (cm)	250	500
Ro	Rodamina % (m/v)	$2,0 \cdot 10^{-2}$	$2,5 \cdot 10^{-2}$
FC	Fluxo carregador ácido acético ( $\text{mol L}^{-1}$ )	1,50	3,0

Ensaio	NBS % (m/v)	HAC / HCl mol.L <sup>-1</sup>	Reator 1 (cm)	Rodamina %(m/v)	Reator 2 (cm)	Fluxo Carregador mol L <sup>-1</sup>
1	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	+
3	-	+	-	-	+	-
4	+	+	-	-	+	+
5	-	-	+	-	+	+
6	+	-	+	-	+	-
7	-	+	+	-	-	+
8	+	+	+	-	-	-
9	-	-	-	+	+	+
10	+	-	-	+	+	-
11	-	+	-	+	-	+
12	+	+	-	+	-	-
13	-	-	+	+	-	-
14	+	-	+	+	-	+
15	-	+	+	+	+	-
16	+	+	+	+	+	+

Fonte: O autor (2017)

#### 5.4.2 Otimização Univariada

Após a triagem, verificou-se que somente a concentração do reagente R<sub>1</sub>, que é uma mistura de ácido acético/ácido clorídrico, apresentou efeito significativo. Assim, essa variável foi selecionada para a etapa seguinte de otimização. Salienta-se que a razão entre as concentrações de ácido acético e ácido clorídrico foi mantida em 1,25. A concentração da mistura dos cinco organofosforados utilizados nesse planejamento foi de 50 mg L<sup>-1</sup>. A tabela 15 mostra as concentrações usadas nesse planejamento.

Tabela 15: Otimização Univariada para a relação do reagente ácido acético/ácido clorídrico

<u>Ácido acético (mol L<sup>-1</sup>) / Ácido clorídrico (mol L<sup>-1</sup>)</u>
0,234 / 0,187
0,468 / 0,375
0,937 / 0,750
1,406 / 1,125
1,871 / 1,150
2,810 / 2,250
3,750 / 3,000

Fonte: O autor (2017)

### 5.4.3 Cromatografia Líquido de alta eficiência

Para verificar a exatidão do método proposto, utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção UV em 220 nm, Shimadzu SPD-10A (Shimadzu Seisakusko Kyoto, Japan), equipado com uma bomba LC-10AS Shimadzu, com detector UV– visível (SDR-10A, Shimadzu) e um injetor automático de 20  $\mu\text{L}$  (Rheodyne). Foi utilizada uma coluna analítica de  $\text{C}_{18}$  Microsorb-MVTM 100 Å (10 cm x 4,6 mm d.i.) e pré-coluna  $\text{C}_{18}$  com tamanho de partícula de 5  $\mu\text{m}$  (2,0 x 4,6 mm d.i.).

A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetonitrila, água produzida em um sistema Milli- Q system (Millipore, EUA) e metanol na proporção de 50:40:10 (v/v), com temperatura de 45°C, bombeada a uma vazão de 1,5  $\text{mL min}^{-1}$ , com volume de injeção de 5,0  $\mu\text{L}$ . A área dos picos foi medida em um integrador Shimadzu C-R6A Chromatopac.

## 5.5 Nanotubos de Carbono

Neste tópico está descrita a metodologia detalhada da funcionalização dos CNT, síntese das nanopartículas magnéticas, síntese do material híbrido MCNT (nanotubo de carbono magnético), recobrimento do MCNT com BSA (M-RACNT) e otimização da etapa de extração dos organofosforados das amostras de alimentos.

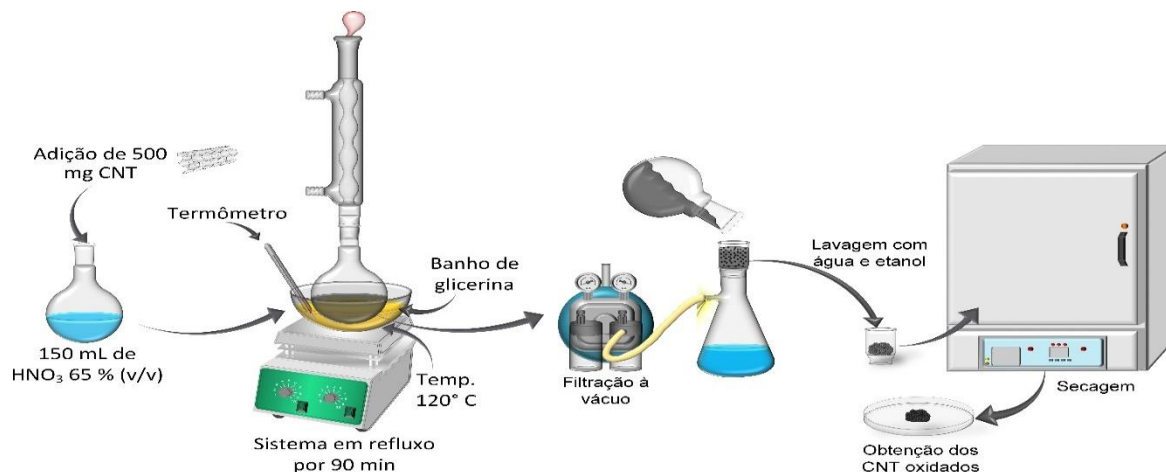
### 5.5.1 Funcionalização dos nanotubos de carbono (NTC)

Os NTC utilizados neste trabalho foram os de paredes múltiplas, adquiridos da Sigma-Aldrich®, produzidos pelo método de Deposição Termoquímica de Vapor e pureza mínima de 95% em massa, diâmetro da parede exterior na faixa de 6 a 9 nm e comprimento de 5  $\mu\text{m}$ .

Uma massa de 500 mg do material puro foi oxidada com 150 mL de  $\text{HNO}_3$  65%, conforme Barbosa *et al.* (2015), sendo a mistura mantida em refluxo durante 90 minutos em uma temperatura de 120°C (LI; CHEN; YAN-PING, 2015). Após esse período de aquecimento, os NTCs já oxidados foram lavados com água destilada até o pH final neutro e,

na sequência, lavados com etanol. A sequência de funcionalização foi esquematizada conforme mostrado na Figura 32.

Figura 32: Sequência das etapas de funcionalização dos NTC

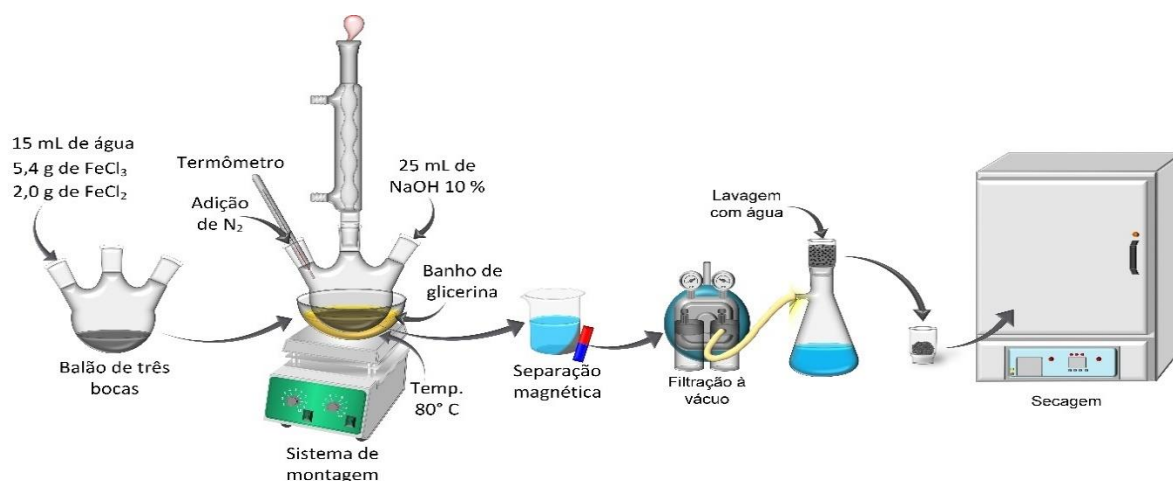


Fonte: O autor (2017)

### 5.5.2 Síntese das nanopartículas magnéticas

O preparo das nanopartículas magnéticas (Figura 33) foi utilizado 100 mL de uma solução contendo 2,0 g de  $\text{FeCl}_2$  e 5,4 g de  $\text{FeCl}_3$  anidro, posteriormente transferidas para um balão de 3 vias de 250 mL. Na via da esquerda foi instalado um funil de separação com um sistema de gotejamento lento ( $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ ), contendo 25 mL de solução de hidróxido de sódio 10% (m/v), na via central foi acoplado um condensador e na via da direita foi inserido um fluxo contínuo de  $\text{N}_2$ . Todo o sistema foi mantido em agitação vigorosa de 150 rpm à temperatura ambiente. Após a formação, as nanopartículas foram separadas com o auxílio de um ímã, lavadas em abundância com água deionizada até pH próximo de 7,0 e levadas para secar em estufa a  $60^\circ\text{C}$  por 24h (CHEN *et al.*, 2012). A Figura 33 mostra as diferentes etapas da síntese das nanopartículas magnéticas. A Figura 34 mostra a atração das partículas na presença de um campo magnético.

Figura 33: Esquema da síntese das nanopartículas magnéticas



Fonte: O autor (2017)

Na figura 34 é possível observar as nanopartículas magnéticas em suspensão, em repouso e com a ação de um campo magnético (ímã).

Figura 34: A) nanopartículas magnéticas em suspensão; B) nanopartículas magnéticas em repouso e C) nanopartículas magnéticas, sob a ação de um campo magnético externo



A)

B)

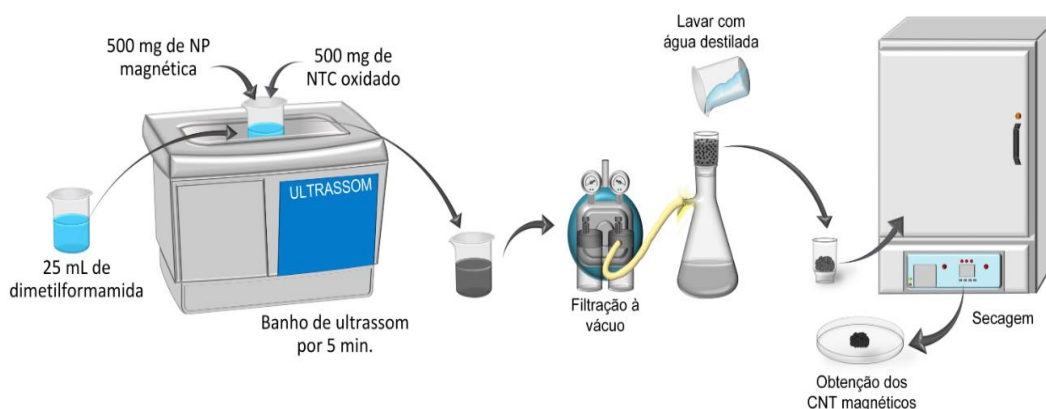
C)

Fonte: O autor (2017)

### 5.5.3 Síntese dos nanotubos de carbono magnéticos (MCNT)

Para o preparo dos CNTs magnéticos (Figura 35), dispersou-se 500 mg do material oxidado, juntamente com 500 mg de nanopartículas magnéticas em 25 mL de dimetilformamida. A mistura foi então homogeneizada em banho ultrassônico durante cinco minutos. Os CNTs magnéticos resultantes foram lavados com água destilada até pH 7,0. O material foi colocado para secar em estufa na temperatura de  $60^\circ\text{C}$ .

Figura 35: Síntese dos MNTC

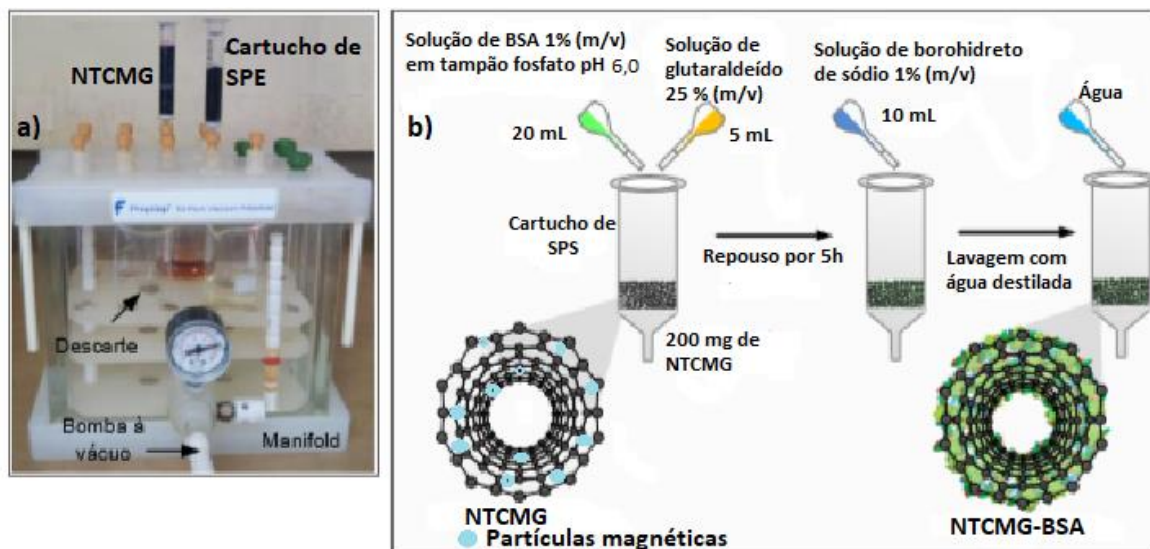


Fonte: O autor (2017)

#### 5.5.4 Revestimento dos MCNTs com albumina bovina (BSA)

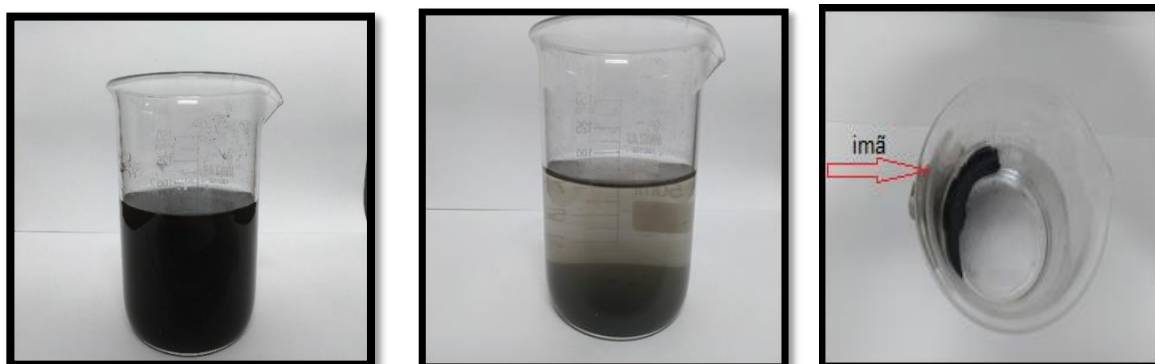
Inicialmente, 500 mg de MCNTCs foram colocados em um cartucho SPE vazio, que foi então acoplado a um coletor tipo sistema de vácuo (Figura 36 A e 36 B). Posteriormente, 20 mL de uma solução de BSA  $0,01 \text{ g mL}^{-1}$ , preparados em tampão fosfato  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $\text{pH} = 6,0$ ), foram percolados através de um fluxo de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ . Posteriormente, 5 mL de uma solução de glutaraldeído 25% (m/v) foram percolados lentamente pelo cartucho, garantindo que todo o material estivesse em contato com a solução e, em seguida, o sistema foi mantido em repouso por 5 H. Finalmente, 10 mL de solução aquosa de borohidreto de sódio na concentração de  $0,01 \text{ g mL}^{-1}$  foram percolados através do material com um fluxo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Após, o material foi exaustivamente lavado com água destilada, para eliminar possíveis resíduos da síntese (BARBOSA *et al.*, 2015). O material foi secado em uma estufa na temperatura de  $50^\circ\text{C}$ . Posteriormente, a atração magnética foi testada utilizando um ímã (Figura 37).

Figura 36: A) Esquema da montagem empregando o manifold e em B) Esquema geral do recobrimento com BSA



Fonte: O autor (2017)

Figura 37: A) M-RACNT em suspensão; B) M-RACNT em repouso; C) M-RACNT sob a ação de um campo magnético externo



A)

B)

C)

Fonte: O autor (2017)

## 5.6 Otimização do Sistema de Pré-Concentração Magnética Dispersiva Usando os M-RACNTs

Neste tópico está descrita a metodologia do procedimento de otimização da extração dos organofosforados das amostras. Para este estudo, foi utilizado um Planejamento Fatorial Fracionário  $2^{5-2}$  e Planejamento Matriz de Dohler.

### 5.6.1 Planejamento Fatorial de Dois Níveis $2^{5-2}$ para a etapa de pré-concentração dos organofosforados com os M-RACNTs

Para a otimização do procedimento na etapa de pré-concentração foram definidas cinco variáveis:

- a) tempo de extração dos organofosforado da amostra (TE);
- b) volume da amostra (VA);
- c) massa de material (M-RACNT);
- d) volume de eluato acetonitrila para a dessorção do organofosforado (VD);
- e) tempo de dessorção (agitação) do material com acetonitrila para a eluição do organofosforado (TE);

Para este estudo foi utilizado um planejamento fatorial fracionário  $2^{5-2}$ , envolvendo um conjunto de oito experimentos, feitos em duplicatas e de forma aleatória. Os planejamentos fatoriais foram realizados com uma mistura de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , com os cinco organofosforados estudados (clorpirifós, diazinon, malation, metamidofós e paration).

Para a execução do planejamento, massas de M-RACNT, foram colocadas em béqueres de 250 mL, com volumes definidos de amostras dos organofosforados (Tabela 16) e agitados conforme tempo relacionado em cada planejamento. Posteriormente, as partículas de M-RACNT foram separadas com o auxílio de um ímã e transferidas para tubos Falcon, porções do eluato acetonitrila foram adicionadas em cada tubo e o material ficou em agitação, conforme os tempos estabelecidos (Tabela 16). Após a extração dos organofosforados do M-RACNT, as porções do eluato acetonitrila, provenientes da pré-concentração, foram evaporados em uma centrífuga rotaevaporadora na temperatura de  $50^\circ\text{C}$  por 30 minutos. Posteriormente, em cada tubo de amostra pré-concentrada foram adicionados 1,5 mL de ácido acético  $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ . Os tubos foram colocados em banho de ultrassom por 2 minutos e, em seguida, as soluções foram homogeneizadas em um agitador de tubos por 30 segundos e

filtradas em membranas PTFE 0,45  $\mu\text{m}$ . As soluções provenientes da pré-concentração tiveram as suas absorbâncias monitoradas pelo espectrofotômetro acoplado ao sistema de análise em fluxo. As medidas de absorbância de cada solução foram realizadas em duplicatas. A tabela 16 apresentam os níveis dos fatores no Planejamento Fatorial Fracionário  $2^{5-2}$ .

Tabela 16: Níveis dos fatores no planejamento Fatorial Fracionário  $2^{5-2}$  para a mistura dos organofosforados Clorpirifós, Diazinon, Malation, Paration e Metamidofós na concentração final de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$

Sigla	Fator	Níveis	
		Mínimo (-)	Máximo (+)
TE	Tempo de Extração (minutos)	10	20
VA	Volume da Amostra (mL)	50	100
M- RACNT	Massa de Nanotubo de Carbono Magnético Revestido (mg)	30	60
VD	Volume de Dessorção (mL)	3	6
TD	Tempo de Dessorção (minutos)	10	20

Ensaio	TE	VA	M- RACNT	VD	TD
1	-	-	-	+	+
2	+	-	-	-	+
3	-	+	-	-	-
4	+	+	-	+	-
5	-	-	+	+	-
6	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	+
8	+	+	+	+	+

Fonte: O autor (2017)

### 5.6.2 Planejamento Matriz de Doehlert

Após a identificação das variáveis com efeitos mais significativos no planejamento Fatorial Fracionário  $2^{5-2}$ , foi utilizado o Planejamento Matriz de Doehlert para encontrar os pontos de máximo de cada variável. No planejamento Matriz de Doehlert (Tabelas 17 e 18) foi usada uma mistura dos cinco organofosforados na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ .

A Tabela 17 mostra o Planejamento Matriz de Doehlert para a mistura dos organofosforados estudados e os níveis de codificação para cada variável significativa obtida no Planejamento Fatorial Fracionário  $2^{5-2}$ .

Tabela 17: Planejamento Matriz de Doehlert das variáveis mais significativas e os níveis codificados para a mistura dos organofosforados na concentração final de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$

Fatores	Níveis Codificados e Reais						
Volume de eluato Acetonitrila (mL)		-0,817 (8,0)	0 (10,0)		+0,817 (12,0)		
M-RACNT (mg)		-1 (60)	-0,5 (65)	0 (70)	+0,5 (75)	+1 (80)	
Volume de amostra (mL)	-0,866 (110)	-0,577 (120)	-0,288 (130)	0 (140)	+0,288 (150)	+0,577 (160)	+0,866 (170)

Valores entre parênteses correspondem aos níveis reais

Fonte: O autor (2018)

Tabela 18: Planejamento Matriz de Doehlert utilizada para a mistura dos organofosforados Clorpirifós, Diazinon, Malation, Paration e Metamidofós com uma concentração final de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$

Experimento	*VA	*M-RACNT	*VE
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	1	0	0
5	0,5	0,866	0
6	0,5	0,289	0,817
7	-1	0	0
8	-0,5	-0,866	0
9	-0,5	-0,289	-0,817
10	0,5	-0,866	0
11	0,5	-0,289	-0,817
12	-0,5	0,866	0
13	0	0,577	-0,817
14	-0,5	0,289	0,817
15	0	-0,577	0,817

Fonte: O autor (2018)

\*VA = volume de amostra; \*M-RACNT = massa de material; \*VE = volume de acetonitrila

## 5.7 Preparo do Branco e das Amostras

Nesta etapa foi descrito o preparo do branco e o preparo das amostras de berinjela, brócolis, couve-flor, leite de soja e vagem verde.

### 5.7.1 Preparo do branco

Para o preparo do branco, mediu-se um volume de 120 mL de água destilada. Posteriormente, foi adicionado 71 mg de M-RACNT e mantido em agitação por 20 minutos. As etapas seguintes foram realizadas da mesma forma, conforme descrito no item 5.6.1 para os procedimentos de extração.

A análise do branco foi realizada em triplicata, pelo sistema FIA e pelo método de referência CLAE.

### 5.7.2 Sistema de extração magnética usando M-RACNTs em amostras de alimentos

As amostras de alimentos foram escolhidas em função dos teores de proteínas e adquiridas de um produtor local. Esses alimentos, por sofrerem ataques de pragas, são combatidos com organofosforados. A tabela 19 mostra o teor de proteína em cada amostra definida para a análise.

Tabela 19: Amostras de alimentos e seus respectivos teores de proteína

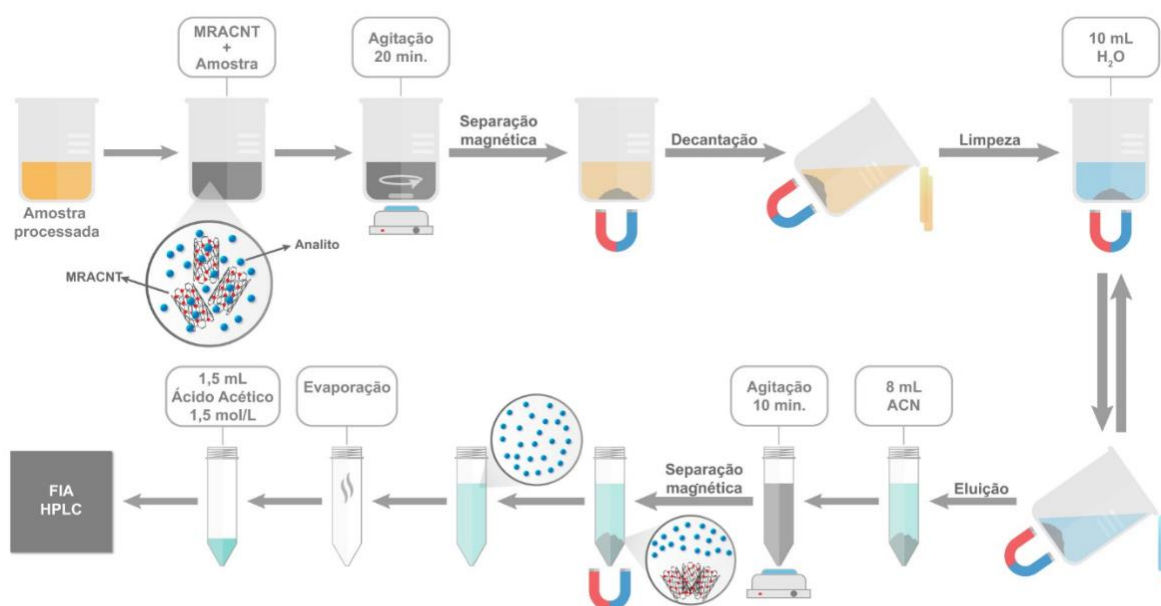
<b>Amostras</b>	<b>% de proteína</b>
Berinjela	1,00
Brócolis	2,80
Couve flor	1,90
Leite de soja	3,30
Vagem verde	1,80

Fonte: Tupynambá e Vieira (1979); Aletor e Adeogun (2002); Fasuyi (2007)

Para o preparo das amostras, pesou-se uma massa de 300 g de cada alimento, a qual foi transferida para um processador Philips Walita, modelo Powerchop 600 w, ficando sob

trituração por 10 minutos. Posteriormente, na amostra triturada, foram adicionados 360 mL de água destilada e novamente mantido em trituração por mais 10 minutos. Em seguida, o extrato proveniente da amostra foi filtrado em uma peneira de malha de 10  $\mu\text{m}$  e o pH ajustado para 6. A porção de 360 mL do extrato foi dividida em três frações de 120 mL. Posteriormente, as frações foram transferidas para uma mesa agitadora automática. As etapas seguintes foram realizadas da mesma maneira, conforme descrito no item 5.6.1 para o procedimento de extração. A Figura 38 mostra as etapas de extração dos organofosforados usando os M-RACNT.

Figura 38: Procedimento proposto para a fase de extração dos organofosforados usando os M-RACNT



Fonte: O autor (2018)

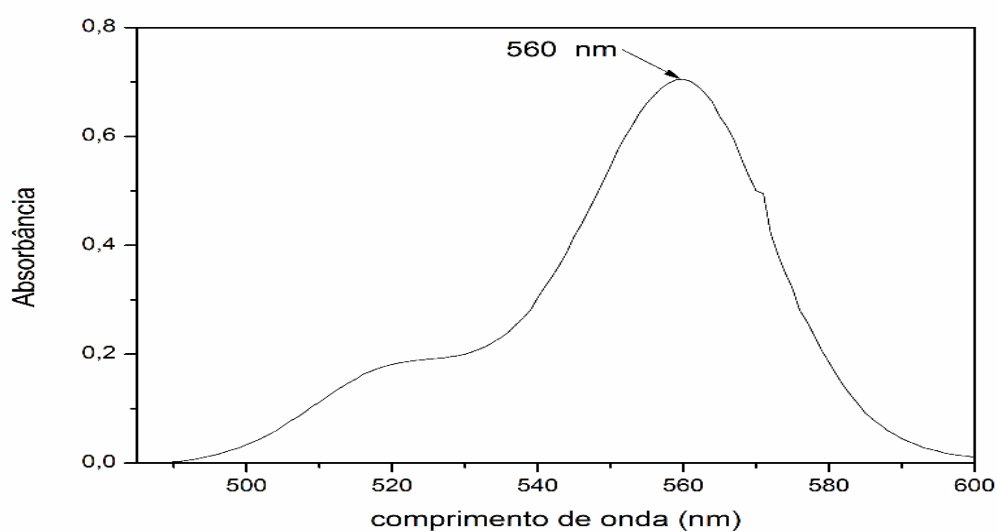
## 5.8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta etapa estão descritos os estudos da varredura espectral, os resultados do recobrimento do material de acesso restrito com BSA, a caracterização do material de acesso restrito, a otimização do sistema de análise em fluxo, o procedimento de extração e a aplicação do método em amostras de alimentos.

### 5.8.1 Varredura Espectral dos Organofosforados

A varredura espectral foi realizada on-line, usando o diagrama do sistema de análise em fluxo proposto (Figura 31A). Uma mistura proveniente de quantidades iguais de cada um dos 5 organofosforados (Clorpirifós, Diazinon, Malation, Metamidofós e Paration) foi preparada na concentração final de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . As concentrações das soluções de acético/ácido clorídrico  $4 \text{ molL}^{-1}$ , N- bromosuccinamida  $0,01\%$  ( $\text{m v}^{-1}$ ) e rodamina B  $0,02\%$  ( $\text{m v}^{-1}$ ) (MATHEW; PILLAI; GUPTA, 2007). A Figura 39 mostra o espectro obtido da mistura dos organofosforados. Nota-se que  $560 \text{ nm}$  foi o comprimento de onda ideal, visto que apresenta maior absorbância (MATHEW; PILLAI; GUPTA, 2007).

Figura 39: Varredura espectral do composto obtido a partir da reação com uma solução de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de organofosforado



Fonte: O autor (2017)

### 5.8.2 Recobrimento dos MCNT Com BSA bovina

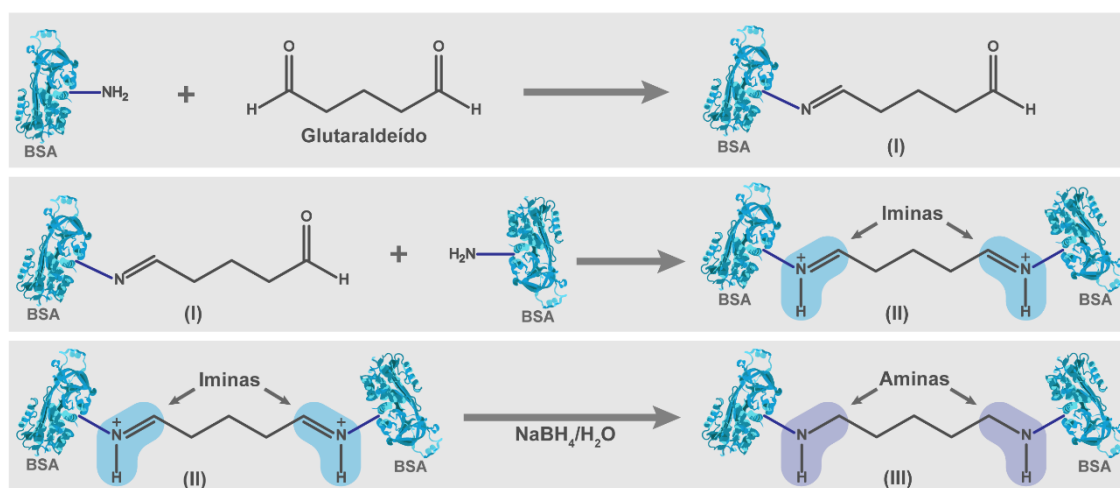
A Figura 40 mostra o diagrama referente ao preparo dos M-RACNT, o qual foi realizado em três etapas:

- a) imobilização e recobrimento com a proteína albumina bovina;
- b) formação das bases de Schiff com a adição do glutaraldeído;

c) redução das iminas e dos grupos aldeídos residuais com a adição de borohidreto de sódio.

Na primeira etapa do recobrimento dos MCNT com albumina, destacou-se o revestimento do material com BSA, na sequência (2ª etapa), a percolação do glutaraldeído através dos MCNT, esse com a função de reagir com as moléculas da proteína BSA, formando bases de Schiff (iminas), o glutaraldeído apresenta grupos aldeídos em ambas terminações, ligam-se às proteínas pelas duas extremidades, promovendo o inter cruzamento das moléculas de BSA, conferindo maior estabilidade ao material e evitando perdas de proteínas na superfície dos M-RACNT (LIMA; CASSIANO; CASS, 2006). A Figura 40 mostra as reações químicas do processo de recobrimento.

Figura 40: Reação entre a BSA imobilizada e o glutaraldeído formando bases de Schiff e, posteriormente, o inter cruzamento de ligações



Fonte: Adaptada de Scurtu *et al.* (2013)

As bases de Schiff formadas na segunda etapa podem sofrer hidrólise, bem como os grupos aldeídos residuais podem reagir com moléculas da amostra a ser utilizada. Assim, para que isso seja evitado, o borohidreto de sódio (3ª etapa) promove a redução das iminas e dos aldeídos, garantindo uma boa estabilidade e durabilidade do M-RACNT (LIMA; CASSIANO; CASS, 2006).

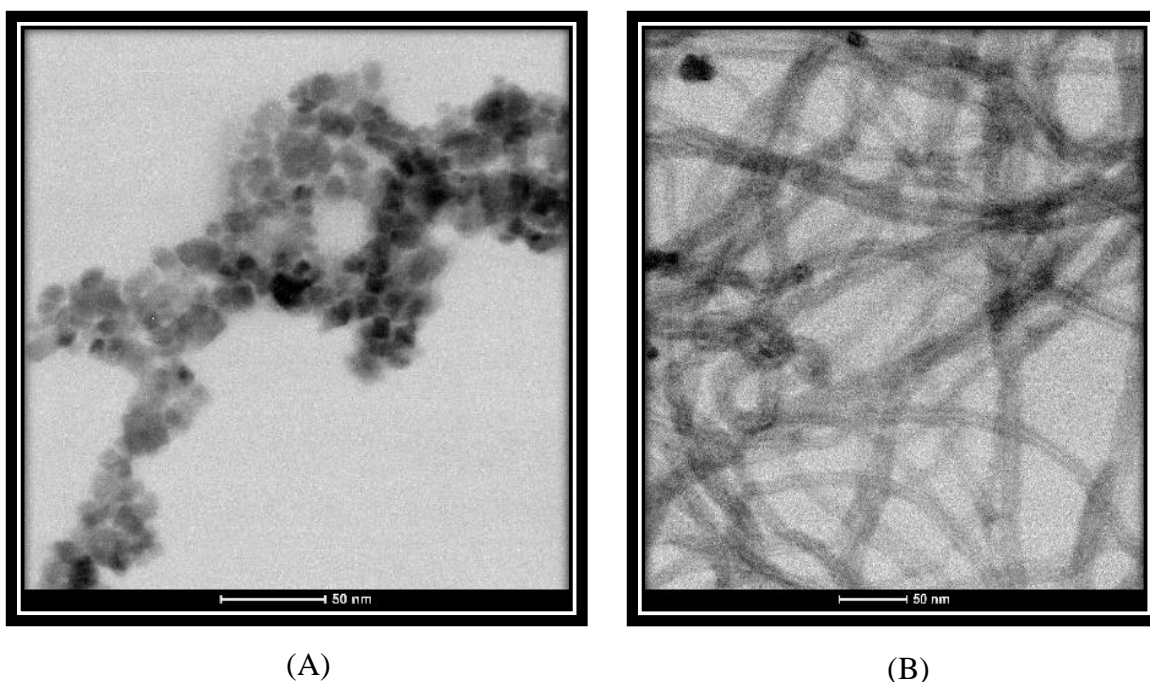
## 5.9 Caracterização dos M-RACNTs

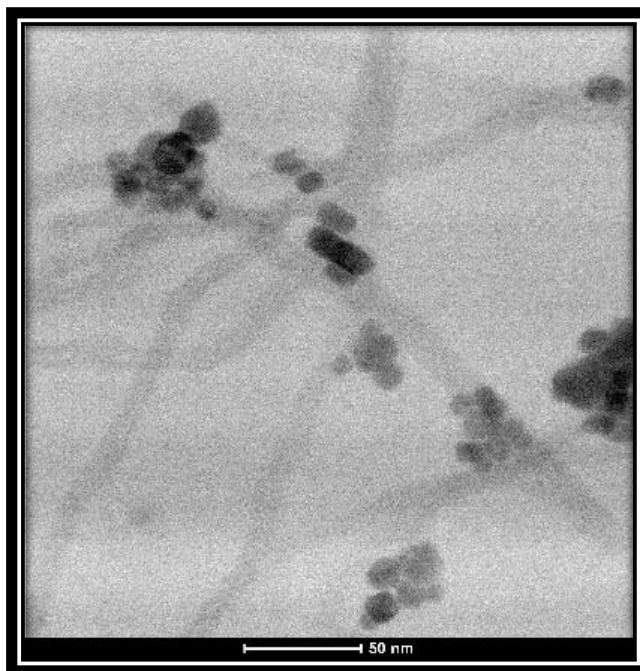
A caracterização do material híbrido foi realizada aplicando a técnica de micrografia eletrônica de transmissão (TEM) e o teste de capacidade de exclusão de proteína usando CLAE.

### 5.9.1 Micrografia Eletrônica de Transmissão

A Figura 41 apresenta as imagens por micrografia eletrônica de transmissão (TEM) 50 nm para as nanopartículas magnéticas de ferro (A), MCNT (B) e M-RACNT (C). Através da análise das imagens, nota-se que a magnetização do material foi satisfatória, sendo observadas as nanopartículas de ferro (Figura 41A) e as nanopartículas de Ferro sobre os CNTs (Figura 41B). Quanto ao revestimento com a BSA, é possível notar na Figura 41C que os M-CNTs apresentaram uma diferença no diâmetro dos tubos, além desses tubos estarem menos escuros na imagem, fato esse que se deve ao revestimento com BSA.

Figura 41: Micrografia eletrônica de Transmissão (A) nanopartículas de ferro, (B) M-CNTs e (C) M-RACNTs





(C)

Fonte: O autor (2017)

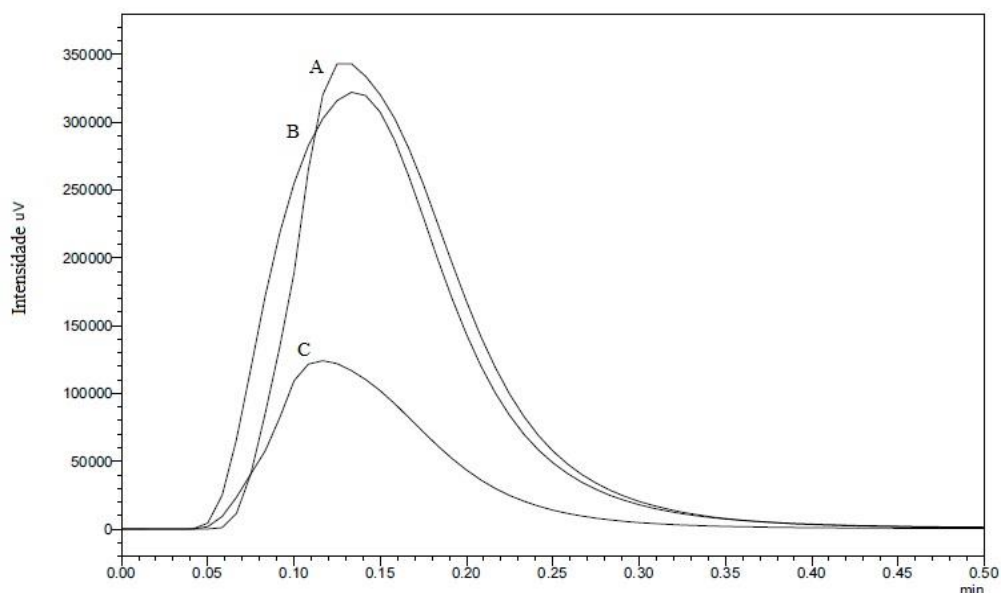
### 5.9.2 Capacidade de Exclusão

A capacidade de exclusão proteica do material (Figura 42 A) foi avaliada, injetando-se, inicialmente, no CLAE, 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de albumina bovina na concentração de 44  $\text{mg L}^{-1}$  em pH 6,0. Para a fase móvel, usou-se uma solução tampão fosfato pH 6,0, (vazão: 1  $\text{mL min}^{-1}$ ). A área do sinal de BSA obtida representa 100% de BSA, ou seja, toda BSA injetada está chegando ao detector e sendo monitorada em 280 nm. A fim de avaliar a exclusão dos M-RACNT foram preparadas e acopladas individualmente no cromatógrafo duas colunas, uma contendo 60 mg de material, sendo esses M-CNT e a outra coluna com M-RACNT. Uma amostra no volume de 50  $\mu\text{L}$  de BSA, na concentração de 44  $\text{mg mL}^{-1}$ , preparada em pH 6,0 foi injetada em cada coluna contendo esses materiais, sendo as absorvâncias de BSA monitorado para cada corrida, usando as colunas individualmente.

O potencial de exclusão de proteínas pelo material pode ser visto na Figura 42 A. A área do pico A (BSA) encontrada foi de 2.313.989, atestando que toda BSA que foi injetada no *loop* de amostragem atingiu o detector. Na injeção de 50  $\mu\text{L}$  de BSA, que passou pela coluna preenchida com M-CNT (C), obteve-se uma área de 777.409. Essa área indica um potencial de exclusão de aproximadamente 33%. Em contrapartida, quando a coluna de M-RACNT foi utilizada, a área do pico dessa (2.356.849) foi praticamente igual à área do pico, obtida com o padrão de BSA pura, sendo o potencial de exclusão de proteínas, para esse

material, de aproximadamente 100%. O potencial de exclusão, do material revestido com BSA, se baseia no ponto isoelétrico da BSA, a saber 4,7 - 5,6. Dessa forma, acima dessa faixa de pH, a proteína está carregada negativamente. Como nos experimentos de exclusão realizados, empregou-se o pH = 6,0, tem-se uma repulsão eletrostática entre a camada de BSA dos NTC e as proteínas da amostra, impedindo a sua adsorção no material.

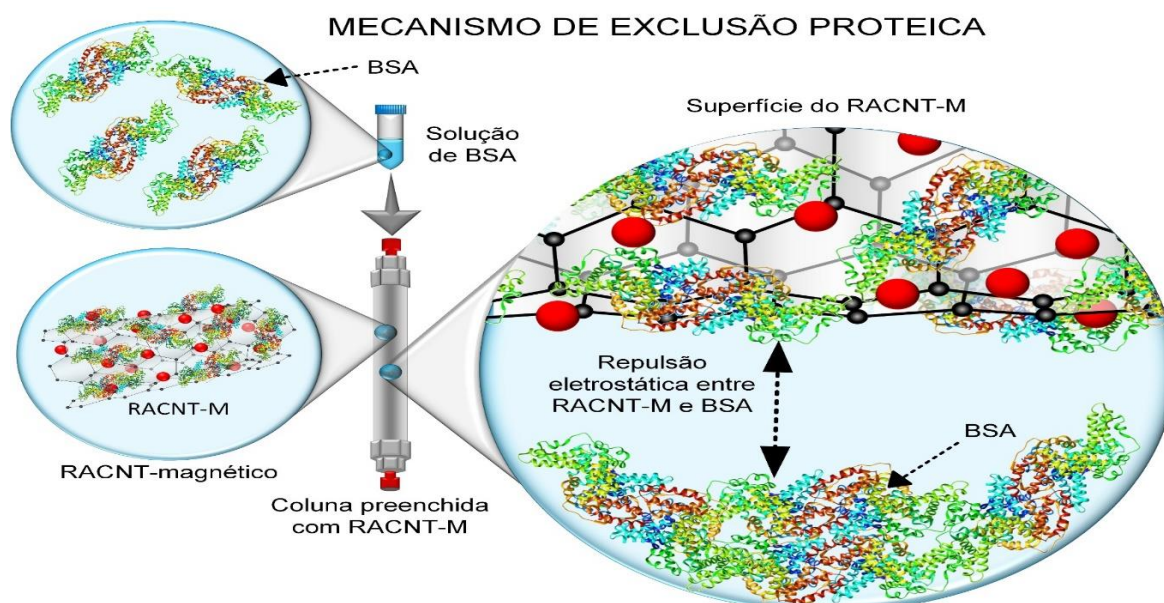
Figura 42: Exclusão de BSA. (A) BSA pura; (B) M-RACNTs e (C) M-CNTs



Fonte: O autor (2018)

A Figura 43, mostra o comportamento de exclusão da proteína da amostra com a albumina que reveste o MNTCs.

Figura 43: Esquema da exclusão de proteína da amostra



Fonte: O autor (2018)

## 5.10 Otimização do Sistema de Análise em Fluxo

Neste estudo foi utilizada a otimização multivariada, através de um planejamento fatorial fracionário de dois níveis ( $2^{6-2}$ ), as variáveis mais significativas foram avaliadas através do Gráfico de Pareto.

### 5.10.1 Planejamento fatorial de dois níveis ( $2^{6-2}$ ) na otimização das variáveis do sistema FIA

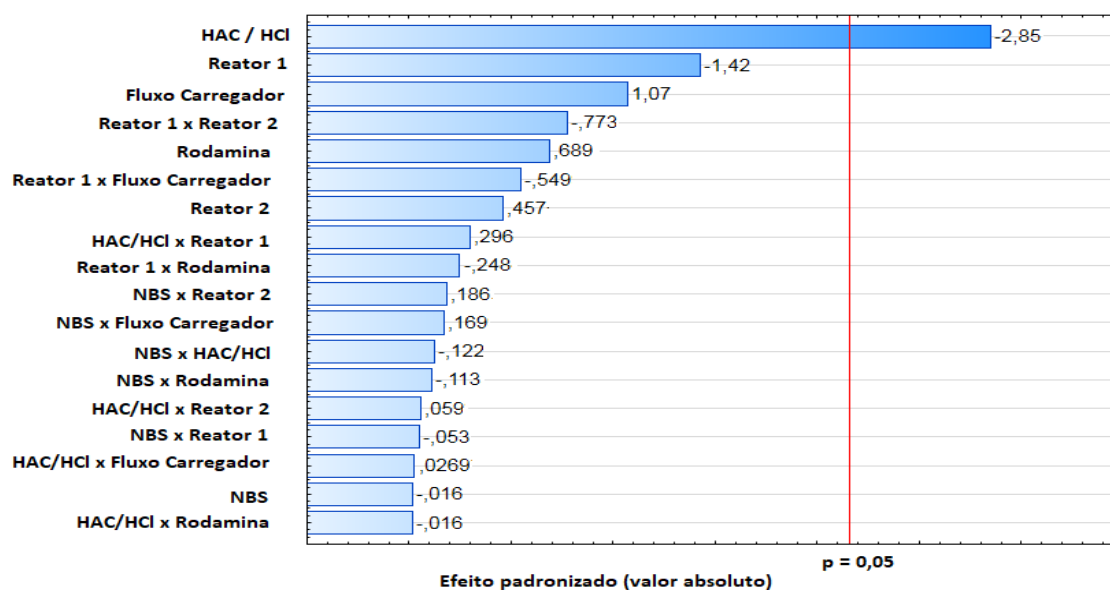
O planejamento fatorial de dois níveis ( $2^{6-2}$ ) foi realizado com o objetivo de investigar de forma preliminar a influência dos fatores no sistema de análise em fluxo.

Os fatores estudados no sistema proposto foram: concentração de N-bromosuccinamida (NBS), concentração da mistura de soluções de ácido acético/ácido clorídrico, comprimento dos reatores  $R_1$  e  $R_2$ , concentração de rodamina B e concentração de ácido acético no fluxo carregador.

Os fatores selecionados foram estudados, utilizando-se o planejamento fatorial de dois níveis ( $2^{6-2}$ ), envolvendo 16 conjuntos de experimentos em triplicata. Nesse planejamento foi utilizada uma solução da mistura dos organofosforados clorpirifós, diazinon, malation, metamidofós e paration na concentração de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ .

Com base no Diagrama de Pareto (Figura 44) é possível observar que as barras horizontais maiores que a linha vertical dada por  $p = 0,05$  representam a significância dos fatores. Nota-se que somente a variável concentração ácido acético/ácido clorídrico apresentou efeito significativo negativo (-2,81), indicando que altas concentrações dessa fração podem prejudicar a reação química. Observa-se também que, quando a relação da concentração desses reagentes passa de  $3,75/3,0 \text{ mol L}^{-1}$  para  $7,50 / 6,0 \text{ mol L}^{-1}$ , tem-se uma diminuição no sinal analítico. Como foi a única variável significativa para o sistema, a mesma foi otimizada através de um planejamento univariado. Para as demais variáveis que não apresentaram efeitos significativos, foram mantidos nos seus menores níveis, concentração de NBS em  $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ \% (m/v)}$ , rodamina B em  $2,0 \cdot 10^{-2} \text{ \% (m/v)}$ , alça de amostragem em 95 cm (0,48 mL) e os reatores  $R_1$  e  $R_2$  em 500 cm e 250 cm, respectivamente.

Figura 44: Representação do Diagrama de Pareto dos efeitos para os fatores estudados, a significância dos mesmos foi avaliada com erro padrão de 5%



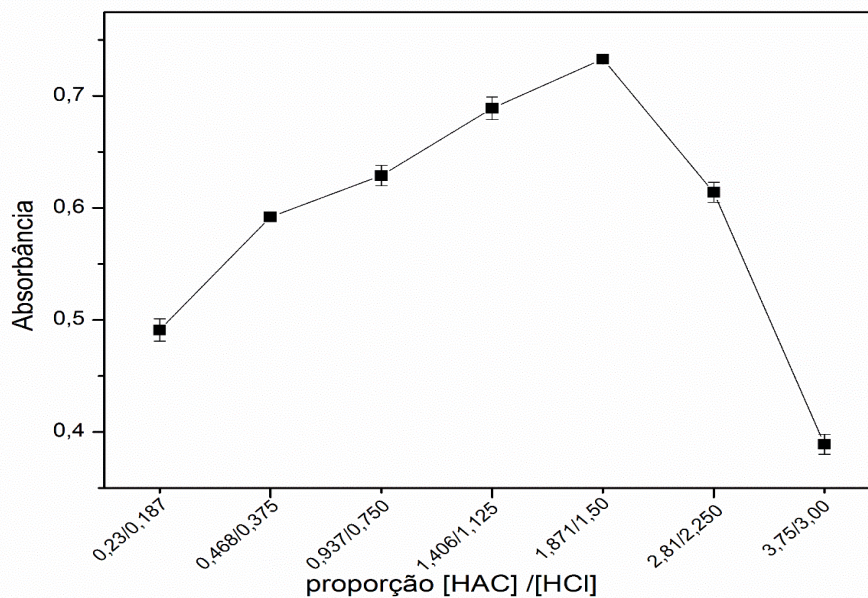
Fonte: O autor (2018)

#### 5.10.2 Efeito da concentração do ácido acético/ácido clorídrico sobre o sinal analítico

A Figura 45 apresenta o efeito da concentração da mistura ácido acético/ácido clorídrico sobre a absorbância. Para esse estudo, variou-se as concentrações de  $0,235 \text{ mol L}^{-1}$  até  $3,75 \text{ mol L}^{-1}$  para o ácido acético e  $0,187 \text{ mol L}^{-1}$  até  $3,0 \text{ mol L}^{-1}$  para o ácido clorídrico, mantendo-se a razão igual a 1,25. Nota-se, pela Figura 45, que o sinal analítico aumenta com o aumento da concentração dos ácidos até  $1,87 \text{ mol L}^{-1}$  para o ácido acético e  $1,50 \text{ mol L}^{-1}$  para o ácido clorídrico, em seguida, a absorbância sofre uma diminuição. Isto pode ser explicado pelo fato de que concentrações elevadas da mistura dos dois ácidos, oxida os organofosforados presentes no meio, sobrando N-bromosuccinamida no equilíbrio, consumindo assim a rodamina B, diminuindo o sinal analítico. Dessa forma, as concentrações de  $1,87 \text{ mol L}^{-1}$  para o ácido acético e  $1,50 \text{ mol L}^{-1}$  para o ácido clorídrico foi estabelecida em todos os experimentos no sistema FIA.

Neste estudo, foi utilizada uma solução da mistura dos cinco organofosforados clorpirifós, diazinon, malation, metamidofós e paration na concentração final de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Figura 45: Otimização Univariada para a solução de ácido acético e ácido clorídrico (mol L<sup>-1</sup>)



Fonte: O autor (2018)

A Tabela 20 mostra os valores otimizados para as variáveis do Planejamento Fatorial Fracionário 2<sup>6-2</sup> para o método de análise em Fluxo (FIA).

Tabela 20: Valores otimizados para as variáveis do Planejamento Fatorial Fracionário 2<sup>6-2</sup> para o método de análise em fluxo

Siglas	Variáveis	Valores significativos
NBS	N-bromossuccinamida % (m/v)	0,005
HAC/HCl	Ácido acético / ácido clorídrico (mol L <sup>-1</sup> )	1,87 / 1,50
R <sub>1</sub>	Reator reacional 1 (cm)	500
R <sub>2</sub>	Reator reacional 2(cm)	250
Ro	Rodamina % (m/v)	0,020
FC	Fluxo carregador ácido acético (mol L <sup>-1</sup> )	1,50
AA	Alça de amostragem (cm)	95 (0,48mL)

Mistura dos organofosforados na concentração de 500 µg L<sup>-1</sup>

Fonte: O autor (2018)

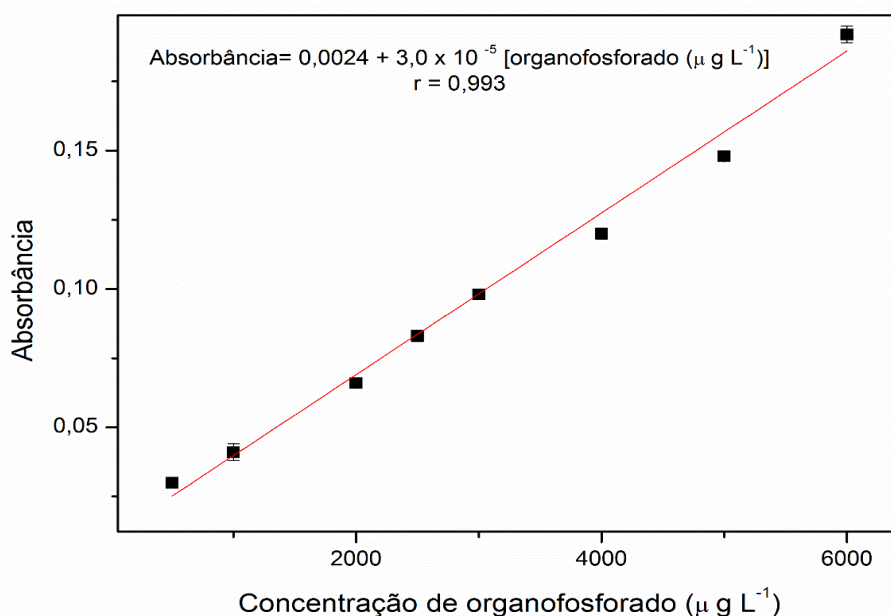
### 5.11 Figuras de Mérito

Para a construção da curva analítica (Figura 46) foram preparadas soluções da mistura dos cinco organofosforados nas concentrações de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $2000 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $2500 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $3000 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $4000 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $5000 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $6000 \mu\text{g L}^{-1}$ , todas em meio aquoso, partindo de uma solução estoque de  $1000 \text{mg L}^{-1}$  em meio ácido acético  $7,5 \text{mol L}^{-1}$

Analisando-se a regressão linear da curva de calibração, observa-se que o valor do coeficiente de correlação obtido ( $r = 0,993$ ) para o sistema, está em concordância com o estipulado ( $r$  mínimo aceitável =  $0,9874$ ) pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003).

A curva analítica para a mistura dos organofosforados na etapa de otimização do método FIA, apresentou a equação:  $\text{Abs} = 0,0024 + 3,0 \cdot 10^{-5} [\text{organofosforado } \mu\text{g L}^{-1}]$ .

Figura 46: Curva de calibração analítica da mistura dos organofosforado clorpirifós, diazinon, malation, metamidofós e paratiom



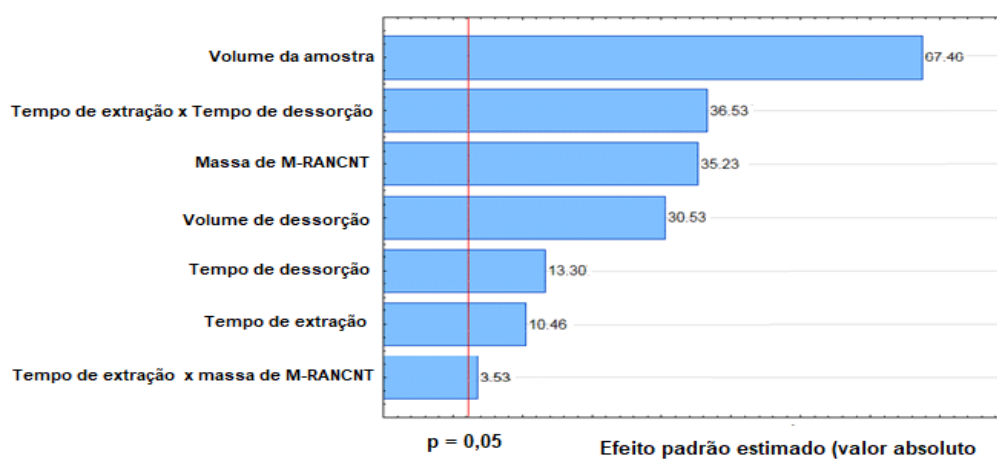
Fonte: O autor (2018)

## 5.12 Planejamento Fatorial de Dois Níveis $2^{5-2}$ para a Otimização da Etapa de Pré-Concentração com os M-RACNT

Os resultados do planejamento fatorial fracionário para a mistura dos organofosforados na etapa de pré-concentração são mostrados na Figura 47.

Com base no Diagrama de Pareto (Figura 47), nota-se que todas as variáveis estudadas apresentaram efeitos de estimativa de contraste nos intervalos avaliados. Barras horizontais maiores que a linha vertical dada por  $p = 0,05$  representam a significância dos fatores.

Figura 47: Representação do Diagrama de Pareto dos efeitos para os cinco fatores estudados, a significância dos mesmos foi avaliada com erro padrão de 5%



Fonte: O autor (2018)

A variável que mostrou ser mais significativa foi o volume da amostra (VA). Observa-se que quando varia o volume da amostra (50 mL para 100 mL), tem-se um incremento no sinal analítico, que pode ser notado pela estimativa de efeito de contraste positivo (67,40). Esse fato está diretamente relacionado com a quantidade de organofosforados presentes na alíquota da amostra com o aumento do seu volume, ou seja, maior quantidade de analito no meio.

Quando a massa de M-RACNT é aumentada de 30 mg para 60 mg, ocorre uma estimativa de efeito de contraste positivo (35,23), o que é esperado, pelo fato de que aumentando a massa de material, aumenta-se a área superficial para a adsorção da mistura dos organofosforados da solução e, conseqüentemente, um aumento no sinal analítico.

Um efeito positivo (30,53) também foi observado quando o volume de dessorção (eluato acetonitrila) foi alterado de 3 mL para 6 mL. Isso pode ser esclarecido em função de que maior quantidade de eluato, aumenta a lixiviação do organofosforado retido na superfície do M-RACNT, contribuindo, assim, para o aumento do sinal analítico.

Outro fator estatisticamente significativo e com efeito de contraste positivo (14.48) foi o tempo de dessorção (TD), aumentando o tempo de agitação do M-RACNT com o eluato acetonitrila de 10 minutos para 20 minutos, foi observado um acréscimo no sinal analítico. Essa significância pode ser explicada pelo maior tempo de contato solvente/M-RACNT, contribuindo, assim, para uma melhor extração dos organofosforados da matriz.

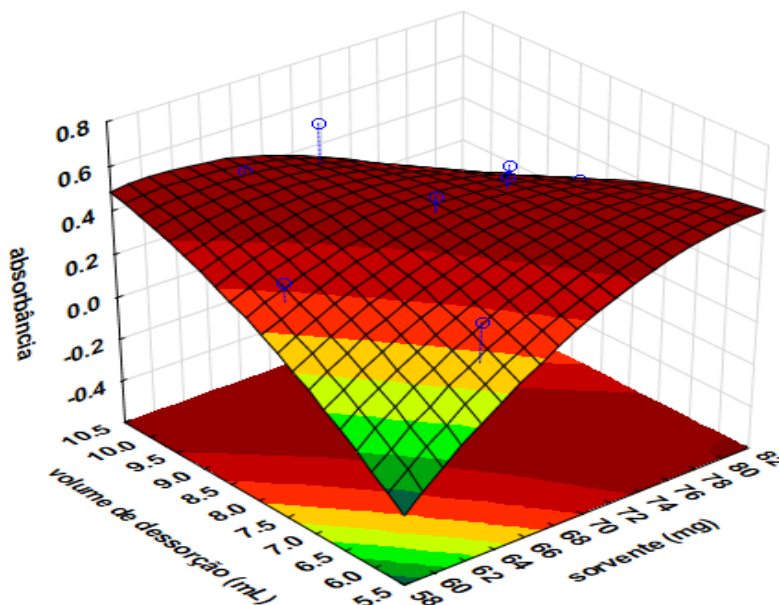
A análise dos resultados do planejamento fatorial de dois níveis, nos informou que os fatores: volume de amostra (VA), massa de M-RACNT e o volume de dessorção (eluato acetonitrila), foram os que apresentaram efeitos mais significativos e, portanto, foram avaliadas, utilizando o Planejamento Matriz de Doehlert. Dessa forma, o tempo de extração (TE) e o tempo de dessorção (TD), mesmo apresentando efeitos significativos positivos, porém em menores proporções, foram fixados em 20 minutos, nos seus maiores níveis.

### **5.12.1 Planejamento Matriz de Doehlert**

Com os três fatores mais significativos encontrados no planejamento fatorial fracionário, foi possível estabelecer as condições para a execução do planejamento utilizando a Matriz de Doehlert, para a mistura dos organofosforados na fase de pré-concentração da amostra.

A Figura 48 mostra as superfícies de resposta para os fatores significativos: (a) massa de M-RACNT e o volume de dessorção (eluato acetonitrila) (VD); (b) volume de dessorção (eluato acetonitrila) (VD) e a massa de M-RACNT; (c) volume de dessorção (eluato acetonitrila) (VD) e volume de amostra (VA).

Figura 48: A) Superfície de resposta referente a etapa de pré-concentração para a análise da mistura dos organofosforados na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$



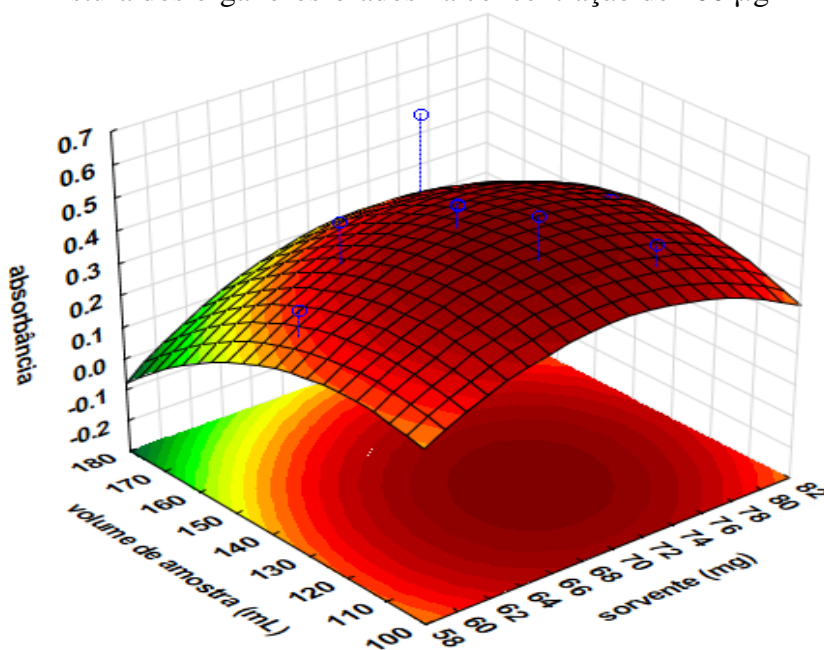
A

Fonte: O autor (2018)

A figura 48A mostra a relação da massa do sorvente M-RACNT e o volume de dessorção (eluato acetonitrila). Analisando a superfície de resposta, é possível verificar o aumento no sinal analítico com o aumento das duas variáveis. Para a massa de M-RACNT, o sinal analítico aumenta consideravelmente até próximo de 71 mg, posteriormente, com o aumento contínuo da massa de material, não ocorre variação significativa na absorvância. Isso pode ser atribuído ao fato de que a massa de M-RACNT de 71 mg é suficiente para adsorver toda concentração de organofosforado disponível no meio.

Para o volume do dessorvente acetonitrila, o sinal analítico aumenta consideravelmente até 10 mL, posteriormente não ocorre mudanças significativas na absorvância. Isso mostra que 10 mL é suficiente para a lixiviação de todo o organofosforado adsorvido na superfície do material, confirmando, dessa forma, a relação com a massa de M-RACNT.

Figura 48: B) Superfície de resposta referente à etapa de pré-concentração para a análise da mistura dos organofosforados na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$

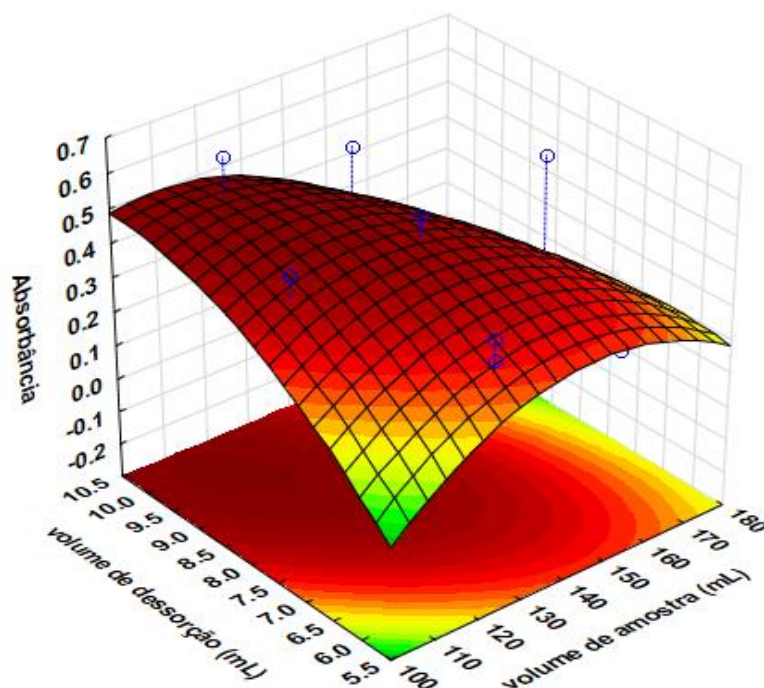


B

Fonte: O autor (2018)

A figura 48B mostra a relação da massa do sorvente M-RACNT e o volume de amostra. Analisando a superfície de resposta, é possível verificar um aumento no sinal analítico com o aumento do volume de amostra e da massa de M-RACNT. Posteriormente, o sinal analítico diminui com o aumento contínuo das duas variáveis, principalmente para o volume da amostra. Para a massa de M-RACNT, o sinal analítico aumenta até próximo de 71 mg, posteriormente, ocorre uma diminuição no sinal. Isso pode ser explicado pelo fato de que, aumentando o volume de amostra, é disponibilizada uma quantidade maior do organofosforado no meio. A massa de M-RACNT no meio, não apresenta área suficiente para fazer a adsorção, mantendo, dessa forma, sobras de organofosforado em solução, ou seja, o material está sendo saturado, ficando os pontos de máximo para o volume da amostra em 120 mL e a massa de M-RACNT em 71 mg.

Figura 48: C) Superfície de resposta referente à etapa de pré-concentração para a análise da mistura dos organofosforados, na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$



C

Fonte: O autor (2018)

A figura 48C mostra a relação do volume de desorção (eluato acetonitrila) e o volume de amostra. Analisando a superfície de resposta, é possível verificar o aumento no sinal analítico com o aumento das duas variáveis e, posteriormente, o sinal analítico diminui para valores acima de 120 mL (amostra). Isso pode ser explicado pelo fato de que, aumentando o volume da amostra, a área de M-RACNT não é suficiente para adsorver a quantidade de organofosforados disponível na amostra e o volume de 10 mL é suficiente para fazer a lixiviação do organofosforado adsorvido no material.

Os pontos críticos foram: 10 mL para o volume de acetonitrila, 71 mg para a massa M-RACNT e 120 mL para o volume da amostra. A tabela 21 mostra os valores otimizados após o Planejamento usando Matriz de Doehlert para a etapa de pré-concentração.

Tabela 21: Valores otimizados para os pontos de máximo no Planejamento Matriz de Doehlert para os organofosforados analisados nas etapas de pré-concentração

Variáveis significativas	Valor otimizado
(TE) Tempo de Extração (minutos)	20
(VA) Volume de Amostra (mL)	120
(MNTCNG) Massa de material (mg)	71
(VD) Volume de dessorção (mL)	10
(TD) Tempo de dessorção (minutos)	20

Mistura dos organofosforados na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$

Fonte: O autor (2018)

### 5.13 FIGURAS DE MÉRITO

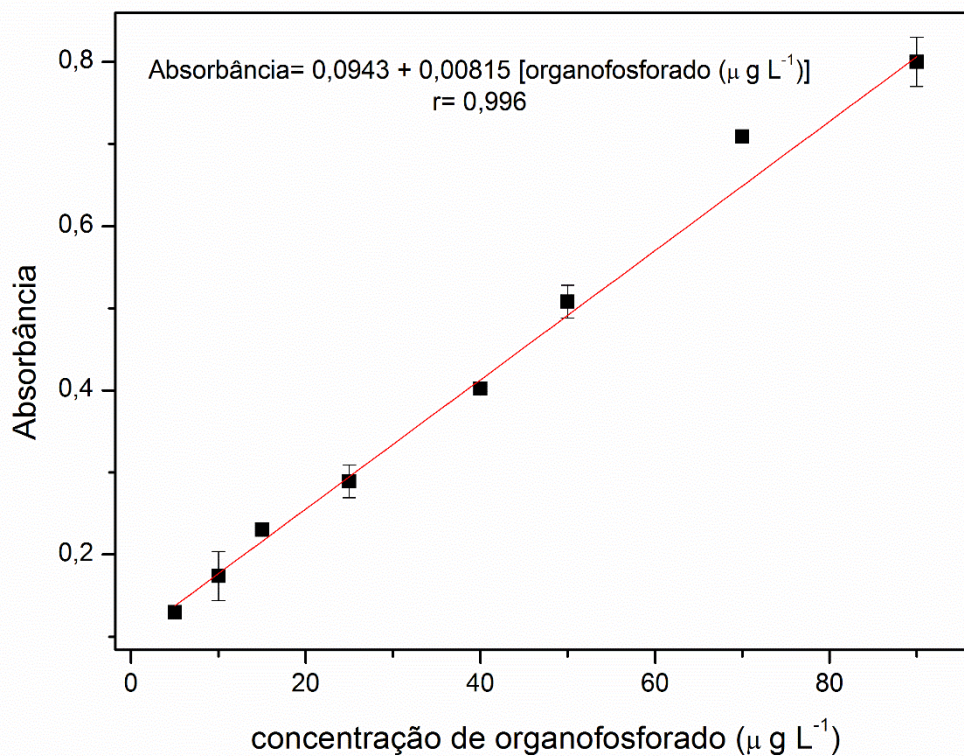
Nesta etapa foi descrita a faixa linear de resposta, o limite de detecção, o limite de quantificação e a frequência analítica do método desenvolvido.

#### 5.13.1 Faixa de resposta linear na etapa de pré-concentração

Para a construção da curva analítica, foram utilizadas soluções da mistura dos cinco organofosforados nas concentrações de  $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $15 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $25 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $40 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $70 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $90 \mu\text{g L}^{-1}$ . Todas as soluções foram preparadas em meio aquoso, partindo da solução estoque preparada em dimetilformamida.

Analisando-se a regressão linear da curva de calibração (Figura 49), observa-se que os valores do coeficiente de correlação obtido para o sistema, está em concordância com o estipulado ( $r$  mínimo aceitável = 0,9874) pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003).

Figura 49: Curva de calibração analítica da mistura dos organofosforado clorpirifós, malation, diazinon, metamidofós e paratiom na etapa de pré-concentração



Fonte: O autor (2018)

A curva analítica na etapa de pré-concentração com o método FIA proposto, apresentou a equação:  $\text{Abs} = 0,0943 + 0,00815 [\text{organofosforado } \mu\text{g L}^{-1}]$ , com coeficiente de correlação  $r = 0,996$ . O método apresentou faixa linear de  $5 \mu\text{g L}^{-1} - 90 \mu\text{g L}^{-1}$ , LD de  $0,74 \mu\text{g L}^{-1}$ , LQ de  $2,44 \mu\text{g L}^{-1}$ , fator de pré-concentração de 271 vezes e RSD inferior a 3.67%. A exatidão do método foi avaliada em comparação com a técnica por CLAE os resultados foram condizentes (*teste-t* para a comparação de médias, 95% de confiança). O método foi aplicado com sucesso em cinco amostras de alimentos (Brócolis, Berinjela, Couve-Flor, Leite de Soja e Vagem verde).

A tabela 22 mostra as características analíticas obtidas, usando o material híbrido desenvolvido.

Tabela 22: Características analíticas obtidas usando o material M-RACNT com o método FIA proposto

Parâmetros	Resultados
Faixa linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	5 a 90
Limite de detecção ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0,74
Limite de quantificação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	5,00
Fator de pré-concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	167
Eficiência de concentração ( $\text{min.}^{-1}$ )	11.85
Índice de consumo (mL)	0,50
Frequência de leitura (Leituras $\text{h}^{-1}$ )	6

Fonte: O autor (2018)

### 5.14 Características Analíticas

De posse dessas características analíticas, o método foi comparado com outros trabalhos reportados na literatura, envolvendo a determinação de resíduos de organofosforados usando diferentes técnicas. A Tabela 23 apresenta a comparação do método desenvolvido com alguns trabalhos reportados na literatura. Nota-se que o método proposto apresentou bom limite de detecção e a principal vantagem é a introdução direta do M-RACNT na amostra sem preparo prévio.

Tabela 23: Comparação de diferentes métodos analíticos para a determinação de organofosforados em diferentes tipos de amostras

Técnica	Amostra	Preparo amostra	Limite de detecção	Ref.
GC – MS / MS	urina	Extração líquido/líquido	$0,5 \mu\text{g L}^{-1}$	Berman <i>et al.</i> (2016)
Digital image	Vegetais	Extração líquido/líquido	$0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$	Sun <i>et al.</i> (2017)
HPLC-UV	Suco de frutas	MIP-Magnético	$0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$	Xie <i>et al.</i> (2014)
GC-MS	Frutas e vegetais	Extração líquido/líquido	$10\mu\text{g kg}^{-1}$	Loughlina <i>et al.</i> (2018)
Espectrofotometria de absorção molecular	Plantas medicinais	Extração em fase sólida.	$0,38 \text{ ng mL}^{-1}$	Liu <i>et al.</i> (2019)
GC	pepino	Extração dispersiva em fase sólida.	$0,1 \text{ mg L}^{-1}$	Bian <i>et al.</i> (2018)
Espectrometria de massa	de Suco gástrico	Dessorção térmica	$10 \mu\text{g. L}^{-1}$	Lee <i>et al.</i> (2018)
<b>Espectrofotometria de absorção molécula na região do visível</b>	<b>Vegetais e Leite de soja</b>	<b>M-RACNTs</b>	<b><math>0,74 \mu\text{g. L}^{-1}</math></b>	<b>Neste trabalho</b>

Fonte: O autor (2018)

### 5.15 Validação do Método On-line e Aplicação em Amostras Alimentícias

O método foi validado para análises de organofosforados em amostras de alimentos com teor protéico. Os testes foram divididos em duas etapas, sendo a primeira somente as amostras, a segunda, foram preparados padrões de calibração analíticos, fortificando as amostras alimentícias sem o preparo prévio (brócolis, berinjela, couve-flor, leite de soja e, vagem verde), com  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  da mistura dos cinco OPs.

A exatidão do método foi checada pela comparação dos resultados obtidos entre as duas metodologias (Tabela 24). Nota-se que não existe diferença significativa entre os dois métodos para um nível de confiança de 95% (teste t de dados pareados). As análises foram realizadas pela técnica proposta por FIA e comparadas com a técnica por CLAE.

Na Tabela 24 é mostrada a porcentagem de recuperação, bem como os teores de organofosforados encontrados nas amostras. Os valores de recuperação dos teores adicionados variaram entre 93,66% e 108,86%. A exatidão também foi avaliada, por meio de teste de comparação pareado. Nota-se que não existe diferença significativa entre os dois métodos para um nível de confiança de 95% (teste t de dados pareados).

Tabela 24: Aplicação e validação do método para a determinação de organofosforados em amostras diversas

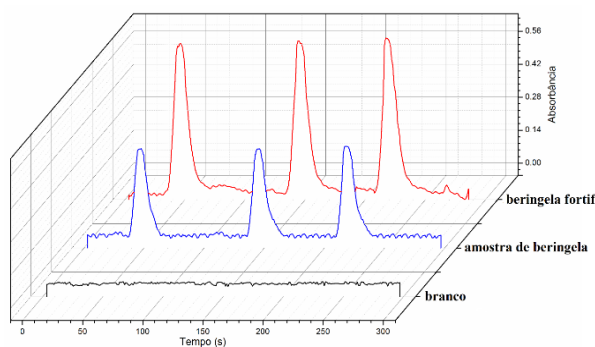
Amostras	F.I.A ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) Amostra	<sup>a</sup> F.I.A ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) Amostra + adição $30 \mu\text{g L}^{-1}$ OFs	% Recuperação (FIA) + adição de $30 \mu\text{g L}^{-1}$ OFs	<sup>a</sup> HPLC ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) amostra pura	<sup>a</sup> HPLC ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) recuperação do padrão	% Recuperação (FIA) + adição de $30 \mu\text{g L}^{-1}$ OFs
<b>Brócolis</b>	$77.98 \pm 1.62$	$110,20 \pm 0.70$	107.40	$79.41 \pm 0.30$	$111.20 \pm 0.42$	105.90
<b>Beringela</b>	$33,64 \pm 0.77$	$64.34 \pm 0.90$	102.33	$35.04 \pm 0.23$	$66.05 \pm 0.37$	103.36
<b>Couve – Flor</b>	$30.05 \pm 1,09$	$61.58 \pm 1.36$	105.10	$31.05 \pm 0.32$	$63.80 \pm 0.34$	108.86
<b>Leite de Soja</b>	$41.55 \pm 1,16$	$72.39 \pm 1.56$	102.80	$42.60 \pm 0.29$	$74.30 \pm 0.22$	105.60
<b>Vagem verde</b>	$34.03 \pm 0.90$	$62.04 \pm 0.33$	93.66	$35.39 \pm 0.19$	$64.04 \pm 0.31$	95.50

Resultados expressos com média  $\pm$  D.P (desvio padrão) (n=3), teste t de dados pareados com 95% de confiança  
Fonte: O autor (2018)

Os fiagramas e os cromatogramas do branco, das amostras de berinjela, brócolis, couve-flor, leite de soja e vagem verde e das amostras fortificadas com  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  são mostrados nas Figuras 50 e 51.

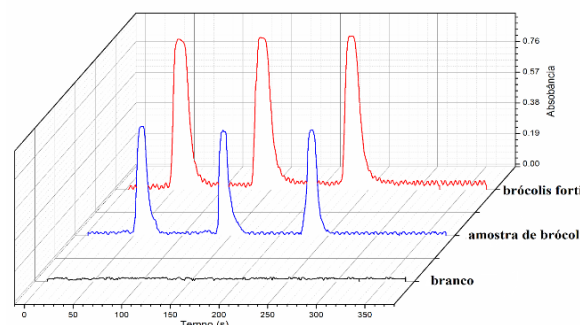
As Figuras 50 A, 50 B, 50 C, 50 D e 50 E mostram os fiagramas em triplicatas do branco, amostras e amostras fortificadas com  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  da mistura dos cinco organofosforados.

Figura 50 A: Fiagrama em triplicata do branco, berinjela e berinjela fortificada com  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  da mistura dos organofosforados



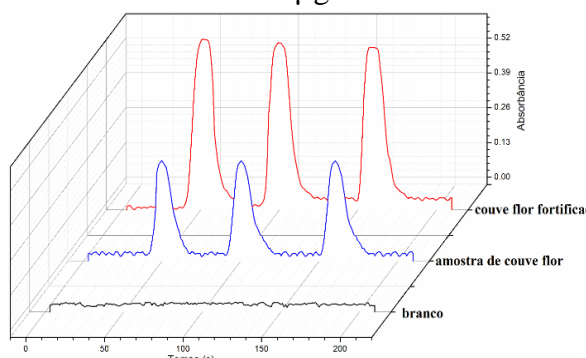
Fonte: O autor (2018)

Figura 50 B: Fiagrama em triplicata do branco, brócolis e brócolis fortificado com  $30 \mu\text{g L}^{-1}$



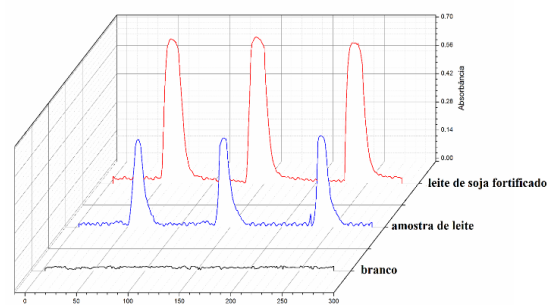
Fonte: O autor (2018)

Figura 50 C: Fiagrama em triplicata do branco, couve-flor e couve-flor fortificada com  $30 \mu\text{g L}^{-1}$



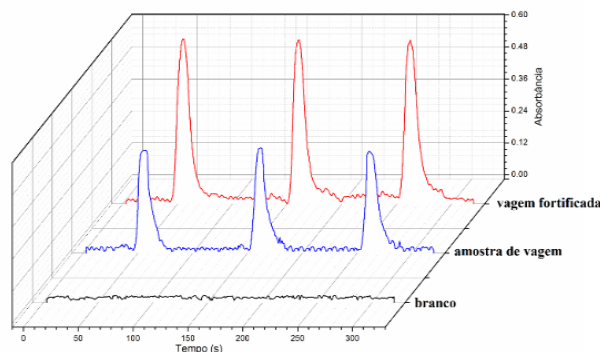
Fonte: O autor (2018)

Figura 50 D: Fiagrama em triplicata do branco, leite de soja e leite de soja fortificado com  $30 \mu\text{g L}^{-1}$



Fonte: O autor (2018)

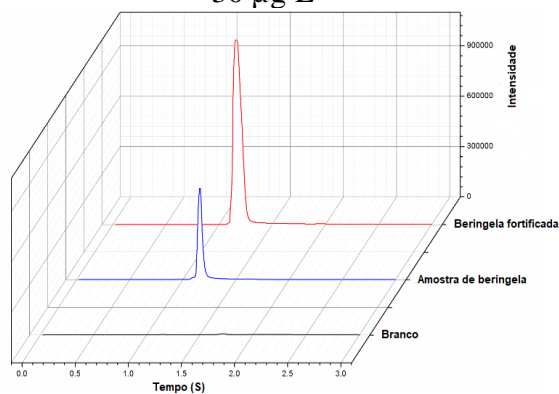
Figura 50 E: Fiagrama em triplicata do branco, vagem verde e vagem verde fortificada com  $30 \mu\text{g L}^{-1}$



Fonte: O autor (2018)

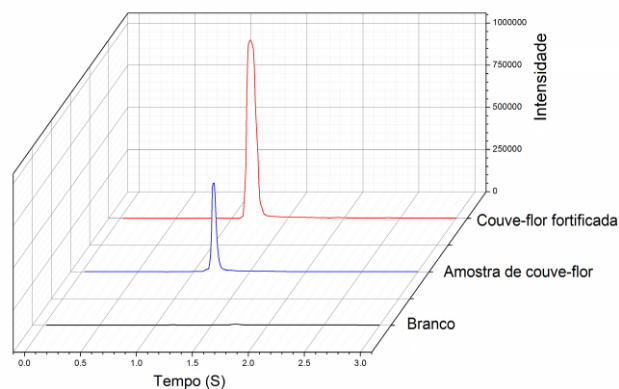
As Figuras 51 A, 51 B, 51 C, 51 D e 51 E mostram os cromatogramas do branco, amostras e amostras fortificadas com  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  da mistura dos organofosforados.

Figura 51 A: Cromatograma do branco, berinjela e berinjela fortificada com  $30 \mu\text{g L}^{-1}$



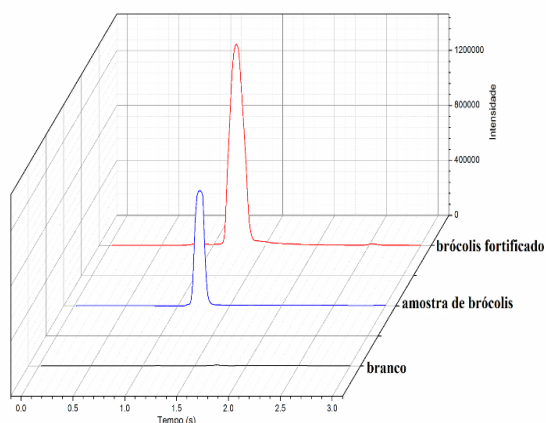
Fonte: O autor (2018)

Figura 51 B: Cromatograma do branco, couve-flor e couve-flor fortificada com  $30 \mu\text{g L}^{-1}$



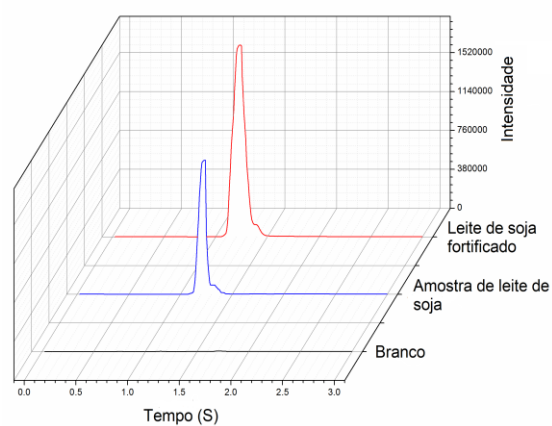
Fonte: O autor (2018)

Figura 51 C: Cromatograma do branco, brócolis e brócolis fortificada com  $30 \mu\text{g L}^{-1}$



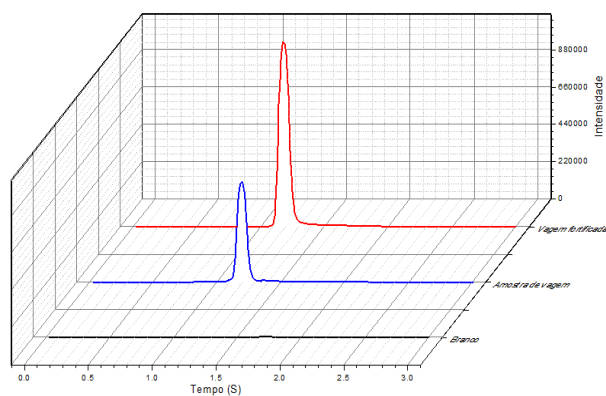
Fonte: O autor (2018)

Figura 51 D: Cromatograma do branco, leite de soja e leite de soja fortificada com  $30 \mu\text{g L}^{-1}$



Fonte: O autor (2018)

Figura 51 E: Cromatograma do branco, vagem verde e vagem verde fortificada com  $30 \mu\text{g L}^{-1}$



Fonte: O autor (2018)

## 5.16 CONCLUSÃO

Os M-RACNT mostraram boa estabilidade química, uma vez que vários ensaios foram realizados usando o mesmo material e apresentaram, também, capacidade elevada para extrair organofosforados de matrizes de alimentos. As proteínas, presentes na matriz das amostras, foram quantitativamente excluídas. Os cinco organofosforados estudados, foram concentrados com elevados fatores de enriquecimento (271 vezes). O método proposto foi otimizado, apresentando baixo limite de quantificação, elevada precisão e exatidão, além de reduzido consumo de reagentes e de amostras. Com uma frequência de 6 análises h<sup>-1</sup> (envolvendo as etapas de preparação e análise da amostra no sistema FIA).

O eluato acetonitrila, foi eficiente na lixiviação dos organofosforados da superfície dos M-RACNT. Quanto às características analíticas, apresentou-se um limite de detecção de 0,74 µg L<sup>-1</sup> e quantificação de 2,44 µg L<sup>-1</sup>.

O sistema FIA, proposto bem como as vantagens conferidas pelo material, possibilitou a aplicação do método em amostras de alimentos contendo proteínas. É um método com baixo consumo de reagentes, estando de acordo com princípios de uma atuação ambientalmente responsável.

A vantagem da utilização dos M-RACNT foi em função da facilidade apresentada para a separação através do paramagnetismo das partículas e com a simples aplicação de um campo magnético externo, como, por exemplo, um ímã utilizado para a separação, sendo realizada em um tempo mais rápido, evitando, assim, perdas desses materiais quando aplicados outros processos de separação, como centrifugação ou filtração.

O revestimento do material com albumina bovina foi realizado para eliminar as etapas convencionais de preparo das amostras, podendo esse material ser aplicado em matrizes biológicas, contendo a presença de proteínas, fator evidenciado mostrado na Figura 42, quando a coluna de M-RACNTs apresentou um potencial de exclusão de proteínas de aproximadamente 100%.

A busca por compostos que minimizem os danos à saúde do homem e ao meio ambiente é necessária, principalmente quando há um cenário em que a aplicação de agrotóxicos é realizada, muitas vezes, de forma incorreta, sem a utilização de equipamentos de proteção individual e em doses acima do necessário.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com pôde ser observado nos dois estudos (sulfaguanidina e organofosforados), é importante ressaltar que o bom desempenho dos métodos analíticos está também diretamente relacionado à adequada otimização dos fatores envolvidos, uma vez que, em condições apropriadas, geram respostas analíticas melhoradas e, logo, maior sensibilidade e menor limite de detecção. As técnicas de quimiometria foram empregadas nesta tese e apresentaram bons resultados no contexto de melhorar as respostas analíticas, nesse caso a absorbância.

Como mostrado no segundo estudo, a modificação da superfície dos CNTs melhorou suas características adsorptivas. Através dos resultados ficaram evidente as vantagens da modificação quando os M-RACNT foram aplicados em extração em fase sólida. As potencialidades do material como extrator foi otimizado e revelou uma melhoria na detectabilidade dos pesticidas, além de ter apresentado boa sensibilidade, pois permitiu a determinação de organofosforados em limites de resíduos em amostras de alimentos.

## REFERÊNCIAS

AIMER, Y.; BENALID, O.; SERRANOC, K. G. Study of the degradation of an organophosphorus pesticide using electrogenerated hydroxyl radicals or heat-activated persulfate. **Separation and Purification Technology**, Saida, Algeria, v. 209, p. 27-33, may. 2019.

ALBAAJI, A. J.; CASTLE, E. G. Mechanical and magnetic properties of spark plasma sintered soft magnetic fecoalloy reinforced by carbon nanotubes. **Journal of Materials Research**. Cardiff, UK, v. 31, p. 3448-3458, oct. 2016.

ALEKSANDR, V. E. Mechanical properties of carbon nanostructures and related materials. **Physics-Uspekhi**, Pingtung, Taiwan, v. 50, p. 225, apr. 2007.

ALMEIDA, A. **Terapêutica Antibiótica das Infecções Orais**. 5. ed. Lisboa, Portugal, Lidel, 2005.

ALVAN, G.; EDLUND, C.; HEDDINI, A. The global need for effective antibiotics - A summary of plenary presentations. **Drug Resistance Updates**, Sweden, v. 14, n. 2, p. 70-76, jan. 2011.

ALETOR, V. A.; ADEOGUN, O. A. Nutrient and antinutrient constituents of some tropical leafy vegetables. **Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 245-346, 1995.

ALLINGER, N.L.; CAVA, M.P.; JOHNSON, C.R.; LEBEL, N.; STEVENS, C.L. **Química Orgânica**. 2. ed., Editora Guanabara, Rio de Janeiro, 1978.

AMA Drug Evaluation. **Publishing Sciences Group Inc.**. 3. ed.. United States, Littleton, 1997. p. 689 - 816.

ANASTASSIADES, M.; LETHOTAV, S.; ŠTAJNBAHER, D.; SCHENCK, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction /partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for determination of pesticide residue in produce. **J AOAC Int.**, Fellback, Germany v. 86, p. 412 - 431, mar. 2003.

ANVISA. **Resolução RDC nº 119, de 19 de maio de 2003**, que institui o PARA-Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3072077/RDC\\_119\\_2016\\_.pdf/9cd4cac1-9fbe-4a05-b0c4-f150a](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3072077/RDC_119_2016_.pdf/9cd4cac1-9fbe-4a05-b0c4-f150a) Acesso em: 15 de janeiro de 2016.

ANVISA. **Instrução Normativa nº 29/2010 - Sistema Integrado de Legislação**.

Disponível em:

<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=41957057615> Set 2010 ... INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 29, DE 14 DE SETEMBRO DE 2010 ... de 22 de dezembro de 2009, no Decreto nº 5.053, de 22 de abril de 2004, no Decreto nº 5.741. Acessado em: 24 de mar. 2017.

ANVISA. **Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), e municipais de vigilância sanitária e laboratórios estaduais de saúde pública. LMRs PARA 2015 (XLS)** - atualizada em 28/09/2015. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acessado em: 28 abr. 2018.

ANVISA. **Agrotóxicos e Toxicologia**. Monografias de Agrotóxicos. 2014. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/avaliacao-toxicologica>. Acesso em: 15 mar. 2017

ANVISA. **RE 899, de 29 de maio de 2003**. Guia Sanitário. Ministério da Saúde: Brasília, 2003. Disponível em: <http://www.latinigroup.com/legislacao/RE899-2011.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2017.

ARCHER, M. C.; TANNENBAUM, S. R.; WISHNOK, J. S. Nitrosamine formation in the presence of carbonyl compounds. *Environmental N-Nitroso Compounds: Analysis and Formation*. **IARC Scientific Publication**, Massachusetts, USA, v. 14, p. 141-145, oct. 1976.

ARAÚJO, D. S. **Análise dos resultados dos planos de controle de resíduos de pesticidas em produtos de origem vegetal: anos 2007-2009**. 2011. 84 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa), Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2011.

ASSIS, C. R. D.; BEZERRA, R. S.; CARVALHO JÚNIOR., L. B. Fish colinesterase as biomarkers of organophosphorus and carbamate pesticides. In: Stoytcheva, Rijeka, Croatia, Ed. Intech, Book 5. **Pesticides in modern world**, 2011.

ARMENTA, S.; GARRIDES, S.; GUARDIA, M. Green Analytical Chemistry. **Trends Anal. Chem.** Burjassot, Valencia, Spain, v. 27, p. 497-511, apr. 2008.

AYSAL, P.; AMBRUS, A.; LEHOTAV, S.J.; CANNA, V. A. Validation of an efficient method for the determination of pesticide residues in fruits and vegetables using ethyl acetate for extraction. **J Environ Sci Heal B**, Budapest, Hungary, v. 42, p. 481 - 490, jun. 2007.

BABIĆ, S.; AŠPERGER D.; MUTAVDŽIĆ D.; HORVAT, A. J. M.; KAŠTELAN-MACAN, M. Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater. **Talanta**, Zagreb, Croatia, v. 70, p. 732-738, jul. 2006a.

BABIĆ, S.; MUTAVDŽIĆ D.; AŠPERGER D.; HORVAT A.J.M.; KAŠTELAN-MACAN, M. Determination of Veterinary Pharmaceuticals in Production Wastewater by HPTLC-Video densitometry. **Chromatographia**, Zagreb, Croatia, v. 65, p. 105-110, jan. 2006b.

BALA, R.; DHINGRA, S.; KUMAR, M.; BANSAL, K.; MITTAL, S.; SHARMA, R.K.; WANGOO, N. Detection of organophosphorus pesticide—Malathion in environmental samples using peptide and aptamer based nanoprobe. **Chem. Eng. J.**, Chandigarh, India, v. 311, p. 111-116, nov. 2017.

BAHAL, N.; NAHATA, M.C. The new macrolide antibiotics azithromycin, clarithromycin, dirithromycin and roxithromycin. **Ann. Pharmacother**, Ohio, USA, v. 26, p. 46-55, jan. 1992.

BARAN, W.; ADAMEK, E.; ZIEMIANSKA, J.; SOBCAZ, A. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. **Journal of Hazardous Materials**, Sosnowiec, Poland, v. 196, p. 1-15, aug. 2011.

BARBOSA, A. F. et. al. Restricted access carbon nanotubes for direct extraction of cadmium from human serum samples followed by atomic absorption spectrometry analysis. **Talanta**, Alfenas, MG, v.131, p. 213-220, jan. 2015.

BARRETT, J. Can biotech deliver new antibiotics? **Current Opinion in Microbiology**, Rahway, NJ, USA, v. 8, v. 5, p. 498-503, aug. 2005.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: planejamento e otimização de experimentos**. 2<sup>a</sup> ed. Campinas: Unicamp, 1996.

BECKER, B.; COOPER, M. A. Aminoglycoside Antibiotics in the 21st Century. **ACS Chem. Biol**, Queensland, Australia, v. 8, p.105-115, oct. 2013.

BEITOLLAHI, H.; EBADINEJAD, F. A magnetic core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/MWCNT nanocomposite modified carbon paste electrode for amplified electrochemical sensing of amlodipine and hydrochlorothiazide. **Analytical Methods**, Kerman, Iran, Royal Society of Chemistry, v. 8, p. 6185-6193, jun. 2016.

BELIN, T.; EPRN, F. Characterization Methods of Carbon nanotubes: a review. **Materials Science and Engineering B**, Poitiers Cedex, France, v. 119, p. 105-118, feb. 2005.

BERGAMIN, F. H.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G. A new device for improving sensitivity and stabilization in flow-injection analysis. **Analytical Chimica Acta**, Piracicaba, SP, Brasil, v. 97, p. 427- 431, aug. 1978.

BERMAN, T. et. al. Urinary concentrations of organophosphate and carbamate pesticides in residents of a vegetarian community. **Environment International**, Nuremberg, Erlangen, Germany v.96, p. 34-40, nov. 2016

BIAN, Y.; LIU, F.; CHEN, F.; SUN, P. Storage stability of three organophosphorus pesticides on cucumber samples for analysis. **Food Chemistry**, Beijing, Chin, v. 250, p. 230-235, jan. 2018.

BLOMBERG, L. G. Two new techniques for sample preparation in bioanalysis: microextraction in packed sorbent (MEPS) and use of a bonded monolith as sorbent for sample preparation in polypropylene tips for 96-well plates. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Karlstad, Sweden, v. 393, p. 797-807, aug, 2009.

BOTSOGLOU, N. A; FLETOURIS, D. J. Drug Residues In: **Foods: Pharmacology, Food Safety and Analysis**, New York, USA: Marcel Dekker, p. 154, 2001.

BOULANOUAR, S.; MEZZACHE, S.; COMBÉS, A.; PICHON, V. Molecularly imprinted polymers for the determination of organophosphorus pesticides in complex samples. **Talanta**, Paris, France, v. 176, p. 456-478, aug. 2018.

BRADBERRY, S. M.; CAGE, S. A. PROUDFOOT A. T.; VALE, J. A. Poisoning due to pyrethroids **Toxicol Rev.**, Birmingham, UK, v. 24, p. 93-106, feb. 2005.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 26, de 9 de julho de 2009.** Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009.

BRASIL. **Resolução RDC nº 53, de 02 de outubro de 2012.** Dispõe sobre o Regulamento Técnico Mercosul - Metodologias Analíticas, Ingestão Diária Admissível e Limites Máximos de Resíduos para Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. Brasília: Diário Oficial da União. 2012. p. 47. n. 192. Seção 1.

BRASIL. **Regulamenta a Lei 7.802, de 1 de julho de 1989,** que dispõe sobre a pesquisa, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. In: Legislação federal de agrotóxicos e afins. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1998. p. 15-53.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999.** Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal-PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne – PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1990.

BRASIL. **Lei nº 7.802, de 11 de Julho de 1989.** Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1989.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução Específica (RE) 899 de 29 de maio de 2003. **Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Brasília: Diário Oficial da União, 2003.

BUJNOWSKI, K.; SYNORADZKI, L.; ZEVACO, T.A.; DINJUS, E.; NAPIORKAWSKA, A.; BURGER, A. **Medicinal Chemistry and Drug Discovery**, 5. ed., New York: Wiley & Sons, v. 39, p. 1003, 1995.

BURGUERA, J. L. **Flow injection atomic spectroscopy.** London: Taylor & Francis, 1989.

BUTLER, M. S.; BLASKOVICH, M. A.; COOPER, M. A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. **J. Antibiot.**, Tokyo, Japan, v. 66, p. 571-91, oct. 2013.

CALATAYUD, J. M. **Flow injection analysis of pharmaceuticals: automation in the laboratory,** London: Taylor & Francis, 1995.

CALDAS, E. D.; MIRANDA, M. C. C.; CONCEIÇÃO, M. H.; SOUZA, L. C. K. R. Dithiocarbamates residues in Brazilian food and the potential risk for consumers. **Food Chem. Toxicol**, Brasília, Brasil, v. 42, p. 1877-1883, jul. 2004.

CARLET, J.; COLLIGNON, P.; GOLDMANN, D.; GOOSSENS, H.; GYSSENS, H.; HARBARTER, S. Society's failure to protect a precious resource: antibiotics. **Lancet.**, São Paulo, Brasil, v. 378, nº. 9788, p. 369-371, jul. 2011.

CAVALIERI, M. J.; CALORE, E. E.; PEREZ; PUGA, N. M. Miotoxicidade por organofosforados. **Ver. Saúde Pública**, São Paulo, Brasil, v. 30, p. 267-272, feb. 1996.

CHAMBERS, H. F.; SANDE, M. A. Antimicrobial Agents, Goodman & Gilman's. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, Hampshire, UK, p. 1029, sept. 1996.

CHADE, J. O. O Brasil passa a ser o 3º maior exportador agrícola do mundo (Correspondente em Genebra). **Estadão**. set. 18. Disponível em: [https://www.correiobraziliense.com.br/app/noticia/economia/2018/09/17/internas\\_economia,706460/brasil](https://www.correiobraziliense.com.br/app/noticia/economia/2018/09/17/internas_economia,706460/brasil). Acessado em: 20 jan. 2019.

CHATTERJEE, N.; YANG, J. Differential crosstalk between global DNA methylation and metabolomics associated with cell type specific stress response by pristine and functionalizes MWCNT. **Biomaterials**, Dongdaemun-Gu, Seoul, South Korea, v. 115, p. 167-180, nov. 2017.

CHEN, H. J.; ZHANG, Z. H.; LUO, J. L.; YAO, S. Z. Surface-imprinted chitosan-coated magnetic nanoparticles modified multi-walled carbon nanotubes biosensor for detection of bovine serum albumin. **Sens. Actuators B**, Hunan, China, v. 163, p. 76, jan. 2012.

CHENG, Z.; DONG, F.; XU, J.; LIU, X.; WU, X.; CHEN, Z.; PAN, X.; GAN, J.; ZHENG, Y. Simultaneous determination of organophosphorus pesticides in fruits and vegetables using atmospheric pressure gas chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. **Food Chem.**, Beijing, China, v. 231, p. 365-373, mar. 2017.

CHENG, Q., WANG, J., JIANG, K. Fabrication and properties of aligned multiwalled carbon nanotube-reinforced epoxy composites. **Journal of Materials Resistance**, Beijing, People's Republic of China, v.23, p. 2975-2983, nov. 2008.

CHEUNG, R.P.; WILLIAMS, D. H. The structure and mode of action glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. **Ann. Rev. Microbiol.**, Cambridge, United Kingdom, Further, v. 38, p. 339,1984.

CHU, S. Y.; SENNELLO, L.T.; BUNNELL, S.T.; WILSON, D.S.; SONNERS, R.C. Pharmacokinetics of clarithromycin, a new macrolide, after single ascending oral doses. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Abbott Park, Illinois, USA, American Society for Microbiology, v. 36, p. 2447-2453, sep. 1992.

CODEX ALIMENTARIUS. **Codex Alimentarius 2012**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.org/about-coodex/en/>> Acesso em: 10 jan. 2018.

COATES, A.; HU, Y.; BAX, R. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, Cheshire, UK, Nature Publishing Group v. 1, n°. 11, p. 895-910, nov. 2002.

CONCEIÇÃO, M. H. Resíduos de pesticidas em alimentos: **Validação de metodologia analítica, análise em frutas e avaliação da exposição da população brasileira pelo método probabilístico**. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2002.

CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. **The Iron Oxides**. Weinheim, New York, VCH, 1996.

CORNELL, R. M.; SSHWERTMANN, U. **The iron oxides: structures, properties, reactions, occurrences and uses 2. ed.** Wiley, New York, Weinheim, 2003.

COUTO, A. B.; RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, E. T. G. Aplicação de pigmentos de flores no ensino da química. **Quim. Nova**, São Carlos, SP, v. 21, p. 221, apr.1998.

CUI, C.; ZHENG, Y.; XIN, Y. Rapid microwave-assisted regeneration of magnetic carbon nanotubes loaded with p-nitrophenol. **Appl. Surf. Sci.**, Qingdao, China, v. 99, p. 346, apr. 2015.

DALCOMO, M.P. Tratamento da Tuberculose Sensível e Resistente. **Pulmão RJ**, Rio de Janeiro, Brasil, v.21, p. 55-99, 2012.

DENG, X.J.; GUI, Q.; CHEN, X.; XUE, T.; WANG, H.; YAO, P. Rapid and effective sample clean-up based on magnetic multiwalled carbon nanotubes for the determination of pesticide residues in tea by gas chromatography–mass spectrometry. **Food Chem.**, Tianjin, China, v. 145, p. 853, sept. 2014.

DEROUICHE, A.; DRISS, M. R.; MORIZUR, J.; TAPHANEL, M. Simultaneous analysis of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in water by headspace solid-phase microextraction with gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A.**, Zarzouna, Tunisia, v. 1138, p. 231-243, nov. 2007.

DOEHLERT, D.H. Uniform Shell designs. **Applied Statistics**, v. 19, p. 231, 1970.

DU, B.; QU, T.; CHEN, Z.; CAO, X.; HAN, S.; SHEN, G.; WANG, L. A novel restricted Access material combined to molecularly imprinted polymers for selective solid-phase extraction and high performance liquid chromatography determination of 2-methoxyestradiol in plasma samples. **Talanta**, Zhengzhou, China, v. 129, p. 465, jun. 2014.

DUBREIL, C. E.; PIROTAIS, Y.; VERDON, E.; HURTAUD-PESSEL, D. Confirmation of 13 sulfonamides in honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry for

monitoring plans: Validation according to European Union Decision. **J. Chromatogr. A.**, France, v. 1339, p. 128-136, mar. 2014.

ECOBICHON, D. J. Toxic effects of pesticides. In: Amdur, M. O. & Klaassen C.D., **Casarett and Doll's toxicology: the basis of poisons**. 6. ed. New York, USA: Mc Graw Hill, 2001.

ERRAYESS, S. A.; LAHCEN, A.A.; IDRISSE, L.; MARCOALDI, C.; CHIAVARINI, S.; AMINE, A. A sensitive method for the determination of sulfonamides in seawater samples by solid phase extraction and UV-Visible spectrophotometry. **Spectrochimica Acta Part A.**, Casablanca, Morocco, v. 181, p. 276-285, mar. 2017.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. São Paulo: Organização Andrei, 2010. p. 112.

FASUYI, A. O. Nutritional potentials of some tropical vegetable leaf meals: Chemical characterization and functional properties. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, nº. 1, p. 49-53, 2006.

FERREIRA, R. G.; SPISSO, B. F.; HORA, I. M. C.; MONTEIRO, M. A.; PEREIRA, M. U.; COSTA, R. P.; CARLOS, B. S. **Panorama da ocorrência de resíduos de medicamentos veterinários em leite no Brasil**, Campinas, SP, v. 19, n. 2 p. 30-49, fev. 2012.

FERREIRA, S. L. C.; BEZERRA, M. A.; SANTOS, W. N. L. Application of Doehlert designs for optimization of on-line preconcentration system for copper determination by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, Salvador, Bahia, v. 61, p. 295-303, jan. 2003.

FERREIRA, S. L. C.; SANTOS, W. N. L.; BEZERRA, M. A.; LEMOS, V. A.; BOSQUESENDRA, J. M. Use of factorial design and Doehlert matrix for multivariate optimisation of an on-line preconcentration system for lead determination by flame atomic absorption spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Salvador, Bahia, v. 375, p. 443-449, jan. 2003.

FIGUEIREDO, E. C.; BARBOSA, A. F.; BARBOSA, V. M. P.; LUCCAS, P. O. **Nanotubos de de carbono restritos à ligação com macromoléculas por meio de recebimento com albumina (RACNT-BSA)**. BR1020140010742, 16 jan. 2014.

FIGUEIREDO, E. C.; MAGALHÃES, C. S.; WISNIEWSKI, C. A low cost autosample for flow injection analysis. **Journal of Automated Methods and Management in Chemistry**, Alfenas, MG, v. 2006, p. 1-4, jul. 2006.

FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. Antibiotics for emerging pathogens. **Science**, Boston, USA, v. 325, p. 1089-1093, aug. 2009.

FREITAS, E. Importância da Agropecuária Brasileira. **Brasil Escola**. 2015. Disponível em: <<https://brasilecola.uol.com.br/brasil/a-importancia-agropecuaria-brasileira.htm>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

FURTADO, R. F.; DUTRA, R. A. F.; ALVES, C. R.; PIMENTA, M. G. R.; GUEDES, M. I. **F. Aplicação de biossensores na análise da qualidade de alimentos**. Fortaleza, Ceará, Embrapa: agroindústria tropical, 2008.

GAJDA, A.; NOWACKA, E. K.; SIKORSKA, M. G.; POSYNIAK, A. Multi-residues UHPLC MS/MS analysis of 53 antibacterial compounds in poultry feathers as an analytical tool in food safety assurance. **Journal of Chromatography B.**, Pulauwy, Poland v. 1104, p. 182-189, nov. 2019.

GAO, Y.; BANDO, Y. Carbon nanothermometer containing gallium. **Nature**, Australia, v. 415, p. 599, jul. 2002.

GETEK, T. A.; VESTAL, M. L.; ALEXANDER, J. The analysis of aminoglycosides antibiotics by capillary electrophoresis. **Journal of pharmaceutical and Biomedical analysis**, Cincinnati, v. 13, p. 809-816, jun. 1995.

GIAKISIKLI, G.; ANTHEMIDIS, N. Magnetic materials as sorbents for metal/metalloid preconcentration and/or separation. A review. **Anal. Chim. Acta**, Thessaloniki, Greece, v. 789, p. 1-16, apr. 2013.

GOMES, A. P.; BATISTA, R. S. Neisseria meningitidis com sensibilidade de intermediários à penicilina. **Associação Med. Bras.**, São Paulo, v. 48, p. 93-117, jun. 2002.

GOULART, S. M.; ALVES, R. D.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, J. H.; ASSIS, T. C.; QUEIROZ, M. E. L. Optimization and validation of liquid-liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. **Analytica Chimica Acta**, Viçosa, Minas Gerais, v. 671, p. 41-47, may. 2010.

GUPTA, V. K.; MORALDI, O.; TYAGI, I.; ARGAWAL, S.; SADAGH, S.; SHAHRYARI-GHOSHEKANDI, H. Study on the removal of heavy metal ions from industry waste by carbon nanotubes: Effect of the surface modification: a review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, New York, USA, v. 46, n°. 2, p. 93-118, jan. 2016.

HAO, C.; HELM, P. A.; MORSE, D.; REINER, E. J. R. Liquid Chromatography-tandem mass spectrometry direct injection analysis of organophosphorus flame retardants in Ontario surface water and wastewater effluent. **Chemosphere**, Ontário, Canada v. 191, p. 288- 295, oct. 2018.

HASE, H.; NISHIUCHI, T.; SATO, T.; OTAKE, T.; YAITA, T.; KOBAYASHI, T.; YONEDA, T. **Journal Hazard Mater**, v.329, p. 49, 2017.

HASSANIA, N.E.A.E; LLOBETC, E.; POPESCU, L.M.; GHITAD, M.; BOUCHIKHID, B.; BARIA, N.E. Development of a highly sensitive and selective molecularly imprinted electrochemical sensor for sulfaguanidine detection in honey samples. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Marocco, v. 823, p. 647-655, jul. 2018.

HE, J.; SONG, L.; CHEN, S.; LI, Y.; WEI, H.; ZHAO, D.; GU, K.; ZANG, S. Novel restricted access materials combined to molecularly imprinted polymers for selective solid-phase extraction of organophosphorus pesticides from honey. **Food Chem**, Zhengzhou, China, v.187, p. 331, apr. 2015.

HERRERO-LATORRE, C.J.; BARCIELA, G. Graphene and carbon nanotubes as solid phase extraction sorbents for the speciation of chromium: a review. **Analytica Chimica Acta**, Lugo, Spain, Analytica Chimica Acta Elsevier, 2017.

HIBBERT, D. B. Experimental design in chromatography: a tutorial review. **J. Chromatogra. B**, Sydney, Australia, v. 910, p. 2, jan. 2012.

HOGBERG, L. D.; HEDDINI, A.; CARS, O. The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances. **Trends in Pharmacological Sciences**, Uppsala, Sweden v. 31, n. 11, p. 509-515, nov. 2010. Disponível em: [http:// extranet.agricultura.gov.br](http://extranet.agricultura.gov.br) Acesso em: 12 dez. 2017.

HOLT, J.K.; NOY, A.; HUSER, T.; EAGLESHAM, D.; BAKAJIN, O. Fabrication of a Carbon Nanotube-Embedded Silicon Nitride Membrane for Studies of Nanometer-Scale Mass Transport. **Nano Letters**, Seoul, Republic of Korea v. 4, p 2245-2250, apr. 2004.

HUANG, L.; LI, D. Q.; LIN, Y. J.; EVANS, D. G.; DUAN, X. Influence of nano-MgO particle size on bactericidal action against *Bacillus subtilis var. niger*. **Chinese Science Bulletin**, v. 50, p. 514-519, abr 2005.

HUTH, M.; RICCI, A. J; CHENG, A. G. Mechanisms of aminoglycoside ototoxicity and targets of hair cell protection. **Int. J. Otolaryngol.**, p. 861- 937, apr. 2011.

IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente. **Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins** - conforme art. 41 do decreto nº 4074/2002 (dados atualizados 06/04/2016). Disponível em: [https://www.ibama.gov.br/phocadownload/qualidadeambiental/relatorios/2017/Grafico-Consumo\\_agrotoxicos](https://www.ibama.gov.br/phocadownload/qualidadeambiental/relatorios/2017/Grafico-Consumo_agrotoxicos) Acesso em: 22 de março de 2018

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, Nagoya, Japan, v. 354, p. 56-78, oct. 1991.

IJIMA, S.; ICHIHASHI, T. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. **Nature**, Miyukigaoka, Japan, v. 363, p. 603-605, oct. 1993.

INGLE JÚNIOR, J. D.; CROUCH, S. R. **Spectrochemical Analysis**. New Jersey, USA: Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1988

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Disponível em : <https://council.science/members/iupac-international-union-of-pure-and-applied-chemistry>The **International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)**, established in 1919, is the international body that represents chemistry and related sciences. Acessado em 24 jan. 17

JEAN, S. S.; HSUEH, P. R.; LEE, W. S.; YU, K. W.; LIAO, C. H.; CHANG, F. Y.; KO, W. C.; WU, J. J.; CHEN, Y. H. Carbapenem susceptibilities and non-susceptibility concordance to different carbapenems amongst clinically important Gram-negative bacteria isolated from intensive care units in Taiwan: Results from the Surveillance of Multicentre Antimicrobial Resistance in Taiwan (SMART) in 2009. **Int J of Antimicrob Agents**, Taipei, Taiwan, v. 41, n. 5, p. 457-62, feb. 2013.

JI, H.; WU, W.; LI, F.; YU, X.; JIA, L. Green synthesis of magnetic hybrid adsorbent (CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/nom). **Journal Hazard Mater.**, v. 334, p. 212, jul. 2017.

JOVANOVIĆ, M.; STOJANOVIĆ, B.J. Thorough investigation of the retention mechanisms and retention behavior of amides and sulfonamides on amino column in hydrophilic interaction liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Belgrado, Serbia, v. 1301, p. 27-37, jun. 2013.

KASIOTIS, K.M.; ANAGNOSTOPOULOS, C.; ANASTASIADOU, P.; MACHERA, K. Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC-MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. **Science of the Total Environment**, Athens, Greece, v. 485-486, p. 633-642, jan. 2014.

KIM, D.; SOBEL, A.H.; GENIO, A. D.; CHEN, Y. H.; CAMARGO, S.J.; YAO, M.S.; KELLEY, M.; NAZARENKO, L. The tropical subseasonal variability simulated in the NASA GISS general circulation model. **J. Climate.**, New York, USA, v. 25, p. 4641-4659, jul. 2012.

KOLEV, S. D.; MCKELVIE, I. D. **Advances in Flow Analysis and Related Techniques**. . Amsterdam: Elsevier, v. 54, p. 813, 2008.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Essentials of Medicinal Chemistry**. Nova York: Wiley-Interscience Publication, p. 1204, 1988.

KRIVOHLAVEK, A.; ŠMIT, Z.; BAŠTINAC, M.; ŽUNTAR, I.; PLAVŠIĆ- PLAVŠIĆ, F. The determination of sulfonamides in honey by high performance liquid chromatography-mass spectrometry method (LC/MS). **Journal of Separation Science**, Croatia, v.28, p. 1434-1439, aug. 2005.

KUMAR, N.; KUMAR, H.; MANN, B.; SETH, R. Colorimetric determination of melamine in milk using unmodified silver nanoparticles. **Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.**, Haryana, India, v. 156, p. 89-97, jul. 2016.

LATORRE, C. H.; MENDEZ, J. A.; GARCIS, J. B., GARCIA, S. G.; MARTIN, R. M. P. Crecente, Carbonnanotubes as solid-phase extraction sorbents prior to atomic spectrometric determination of metal species: A review. **Anal. Chim. Acta**, v. 749, p.1-74, oct. 2012.

LEE, C.W.; SU, H.; LEE, R.H.; LIN, Y.P.; TSAI, Y.D.; WU, D.C.; SHICA, J. Point of care identification of organophosphates in gastric juice by ambient mass spectrometry in emergency settings. **Clinica Chimica Acta**, China, v. 485, p. 288-297, oct. 2018

- LI, N.; CHEN, J.; YAN-PING, S. Magnetic graphene solid-phase extraction for the determination of carbamate pesticides in tomatoes coupled with high performance liquid chromatography. **Talanta**, Beijing, China, v. 41, p. 212, abr. 2015.
- LIANG, B.; WANG, G.; YAN, L.; REN, H.; FENG, R.; XIONG, Z.; LIU, A. Functional cell surface displaying of acetylcholinesterase for spectrophotometric sensing organophosphate pesticide. **Sensors and Actuator B: Chemical**, Qingdao, China, v. 279, p. 483-489, sept. 2019.
- LIMA, G. F. **Determinação de sulfeto em água com preparo de amostra por análise em fluxo multissegmentado**. 2010. 90 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de Alfenas. Disponível em: [https://bdtd.unifal-mg.edu.br:8443/bitstream/tede/398/5/Dissertacao%20de%20Giovana%20de%20F%C3%](https://bdtd.unifal-mg.edu.br:8443/bitstream/tede/398/5/Dissertacao%20de%20Giovana%20de%20F%C3%93%20Lima%20-%202010.pdf) Acessado em: 10 de fev. 2017.
- LIMA, V. V. de; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Desenvolvimento de Colunas Cromatográficas de Meios de Acesso Restrito Proteína-Imobilizada e suas Avaliações para Análise de Fármacos com Injeção Direta de Plasma Humano. **Química Nova**, São Carlos, v. 29, p. 72-78, fev. 2006.
- LIU, Y. E.; HUANG, L. Q.; LUO, X. J.; TAN, X. X.; HUANG, C.; ZAPATA, P. C.; MAI, R. X. Determination of organophosphorus flame retardants in fish by freezing-lipid precipitation, solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Guangzhou, China, v. 1532, p. 68-73, dec. 2018.
- LIU, M.; WEI, J.; WANG, Y.; OUYANG, H.; FU, Z. Dopamine-functionalized up conversion nanoparticles as fluorescent sensors for organophosphorus pesticides analysis. **Talanta**. China v.195, p. 706-712, apr. 2019.
- LIVERMORE, D. M.; WILLIAMS, J. D.  **$\beta$ -Lactams: Mode of Action and Mechanisms of Bacterial Resistance**, Antibiotics in Laboratory Medicine. 5ª ed. Wiley Ed. Williams & Wilkins, p. 502-503, 1996.
- LÓLEZ, R.; GONO, F.; ETXANDIA, A.; MILLÁN, E. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection. **Journal of Chromatography B**, Bilbao, Spain, v. 846, p. 298-305, sept. 2007.
- LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: AS-PTA-Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011. v. 190
- LOZOWICKA, B.; KACZYNSKI, P.; PARITOVA, A.E.; KUZEMBEKOVA, G.B.; ABZHLIEVA, A. B.; SARSEMBAYEVA, N. B.; ALIHAN, K. Pesticide residues in grain from Kazakhstan and potential health risks associated with exposure to detectes pesticides. **Food and Chemical Toxicology**, Bialystok, Poland, v. 64, p. 238-248, dec. 2014.

LOUGHLINA, T. M. M.; PELUSOA, L.; ETCHEGOYENA, A.; ALONSOA, L.; CASTRO, C.; PERCUDANI, C.; MARINO, D. J. G. Pesticide residues in fruits and vegetables of the argentine domestic market: Occurrence and quality. **Food Control**, v. 93, p.129-138, 2018

LIU, Y. E.; HUANG, L. Q.; LUO, X. J.; TAN, X. X.; HUANG, C. C.; CORELLA, P. Z.; MAI, R. X. Determination of organophosphorus flame retardants in fish by freezing-lipid precipitation, solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Guangzhou, China, v.532, p. 68-73, dec. 2018.

LIU, D.; CHEN, W.; WEI, J.; LI, X.; WANG, Z.; JIANG, X. A Highly Sensitive, Dual-Readout Assay Based on Gold Nanoparticles for Organophosphorus and Carbamate Pesticides. **Anal. Chem.**, Zhongguancun, Beijing, China, v. 84, p. 4185-4191, apr. 2012.

LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; THELIN, B.; NYSTROM, J., PETTERSEN, J.; BERGMAN, R. Experimental design and optimization. **Chemom. Intell**, Uppsala, Sweden, v. 42, p. 3-40, may, 1998.

MALDANER, L.; SANTANA, C. C.; JARDIM, I. C. S. F. HPLC. Determination of Pesticides in Soybeans Using Matrix Solid Phase Dispersion. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, Campinas, São Paulo, v. 32, p. 972-983, mar. 2008.

MALIK, S.; DUNCAN, E. S.; RUSSELL, J.; TAYLOR, L.T. Extraction and Detection of Sulfamethazine in Spray-Dried Milk. **J. Dairy Sci.**, Blacksburg, USA, v. 77, p. 418-425, feb.1994.

MALITAN, N. T.; MOHD, M. A. Determination of sulfonamides in selected Malaysian swine wastewater by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Kuala Lumpur, Malaysia, v. 1127, p. 154-160, may 2006.

MANI, V.; CHEN, S. M.; LOU, B. S. Three dimensional graphene oxide-carbon nanotubes and graphene-carbon nanotubes hybrids. **J. Electrochem.**, Tao-Yuan, Taiwan, v. 8, p. 11641-11660, sept. 2013.

MARASCHIN, L. **Avaliação do Grau de Contaminação por pesticidas nas águas dos principais rios formadores do Pantanal Mato-Grossense**. 2003. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva), Curso de Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente, Universidade Federal de Mato Grosso. Cuiabá, 2003. Disponível em <http://www.cpap.embrapa.br/teses/online/DST23pdf>. Acesso em: 28 mar. 2018.

MARDONES, C.; RIOS, C.; VARCÁREL, M. Automatic On-line Coupling of Supercritical Fluid Extraction and Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, Cordoba, Spain, v. 72, p. 5736-5739, oct. 2006.

MAUDENS, K.E.; ZHANG, G.F.; LAMBERT, W.E. (2004), "Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatisation and fluorescence detection". **Journal of Chromatography A**, v.1047, p. 85-92, 2004.

MATHEW, S. B.; PILLAI, A. K.; GUPTA, V. K. A rapid spectrophotometric assay the some organophosphorus pesticide residues in vegetable samples. **Spectrochimica Acta Part A.**, Chhattisgarh, India, v. 67, p. 1430-1432, aug. 2007.

MELCHERT, W. R.; REIS, B. F.; ROCHA, F. R. P. Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review. **Anal. Chim. Acta**, Piracicaba, SP, v. 714, p. 8, dec. 2012.

MIRVISH, S. S. **Formation of N-nitroso compounds**: Chemistry, Kinetics, and in vivo occurrence. Toxicology and Applied Pharmacology, Nebraska, USA, v. 31, p. 325-351, 1975.

MICRONAL. **Análises químicas por injeção em fluxo, Meios e Métodos**. v. 41, 1984

MIZUNO, N.; NISHIKATA, M.; MORITA, M.; MIYAKE, K., Gastrointestinal absorption of Sulfaguanidine in neonatal and adult rats. **Journal of Pharmacobio-Dynamics**, Hyogo, Japan, v. 9, p. 787-792, feb. 2002.

MSAGATI, T. Multiresidue determination of sulfonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection. **Talanta**, Gaborone, Botswana, v. 64, p. 87-100, feb. 2004.

MSAGATI, T. A. M.; NGILA, J. C. Voltammetric detection of sulfonamides at a poly(3-methyl-thiophene) electrode. **Talanta**, Gaborone, Botswana, v. 58, p. 605-610, feb. 2002.

MURRAY, B. E.; ARIAS, C. A.; NANNINI, E. C. **Glycopeptides**. 8<sup>a</sup>. ed. Philadelphia: Elsevier, p. 376 – 400, 2015

MUTAVIDŽIĆ PAVLOVIĆ, D.; ĆURKOVIĆ, L.; BLAŽEK, D.; ŽUPAN, J. The sorption of sulfamethazine on soil samples: isotherms and error analysis. **Sci. Total Environ**, Zagreb, Croatia, 497–498, 543–552, aug. 2014.

NAGARAJA, P.; YATHIRAJAN, H. S.; RAJU, C. R.; VASANTHA, R. A.; NAGENDRA, P.; KUMAR, M. S. H. Aminophenol as a novel coupling agent for the spectrophotometric determination of sulfonamide derivatives. **Farmacology**. Mysore, India, v. 58 p. 1295-1300, apr. 2003.

NEVES, C. F. C.; SCHVARTZMAN, M. M. A. M. Variables search technique applied to gas separation. **Química Nova**, Campinas, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 327-329, may. 2002.

NIU, L.; MENG, L.; LU, Q. Folate-Conjugated PEG on Single Walled Carbon Nanotubes for Targeting Delivery of Doxorubicin to Cancer Cells.v. **Macromolecular Bioscience**, Shanghai, China, v. 13, p. 735-744,

OGASAWARA, N.; MATSUSHIMA, M.; KAWAMURA, N.; ATSUMI, K.; YAMAGUCHI, H.; OCHI, H.; KUSATSUGU, Y.; OYABU, S.; HASHIMOTO, N.; HASEGAWA, Y.; UEYAMA, J.; KAWABE, T. Modulation of immunological activity on macrophages induced by diazinon. **Toxicology**, Nagoya, Japan, v. 379, p. 22-30, jan. 2017.

PANG, G.F.; CAO, Y.Z.; ZHANG, J.J.; JIA, G.Q.; FAN, C.L.; LI, X.M.; LIU, Y.M.; LI, Z.Y., SHI, Y.Q. Simultaneous determination of 16 sulfonamides in honey by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 1304-1311, 2005.

PAUDYAL, B. P. Organophosphorus poisoning. **Journal of Nepal Medical Association**, Europe PMC, v. 47, p. 251-258, oct. 2008.

PAVLOCIC, D. M.; NIKSIC, K.; LIVAZOVIC, S.; BRNARDIC, I.; ANZLOVARC, A. Preparation and application of sulfaguanidine-imprinted polymer on solid-phase extraction of pharmaceuticals from water. **Talanta**, Zagreb, Croatia, v. 131, p. 99-115, jun. 2015.

PEI, L.; ZENG, X. Y.; CUI, J. T.; ZHAO, L. J.; YU, Z. Q. Determination of Seven Urinary Metabolites of Organophosphate Esters using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Chinese Journal Of Analytical Chemistry**, Guangzhou, China, v. 45, p.1648-1654, jul., 2017.

PENG, L.; XU, L. Q.; LONG, M. Y.; JUN, J.; YING, W.; YANG, T. Determination of organophosphate esters in human serum using gel permeation chromatograph and solid phase extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. **Chin. J. Anal. Chem.**, Beijing, China, v. 43, p. 1033-1039, jan. 2015.

PENA, M. S.; SALINAS, F.; MAHENDERO, M. C.; AARON, J. J. Spectrofluorimetric determination of sulphonamides in pharmaceutical compounds and foods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Badajoz, Spain, v. 10, p. 805-808, may 1992.

PEREIRA, A. L.; PITA, J. R. Alexander Fleming (1881-1955) Da descoberta da penicilina (1928) ao Prémio Nobel (1945). **Revista da Faculdade de Letras, História**, Porto, v. 6, p. 129-151, 2005.

PIETRON, W. J.; CYBULSKI, W.; KRASUCKA, D.; MITURA, A.; KOS, K.; ANTCZAK, M. Determination of five sulfonamides in medicated feedingstuffs by liquid chromatography with ultraviolet detection. **Bull. Vet. Inst. Pulawy**, Pulawy, Poland, v. 57, p. 545-552, nov. 2013.

PIRES, D. X.; CALDAS, E. D.; RECENA, M. C. P. Intoxicações provocadas por agrotóxicos de uso agrícola na microrregião de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, no período de 1992 a 2002. **Cad. Saúde Pública**, Mato Grosso do Sul, Brasil, Scielo Pub, v. 21, n.3, p.804-814, 2005.

POUDEL, Y. R.; LI, W. Synthesis, properties, and applications of carbon nanotubes filled with foreign materials: a review. **Materials Today Physics**, v. 7, p. 7-34, dez. 2018.

RAGHUVVEER, S.; RAJU, I. R. K., VASTU, D. K.; SHRIVASTAVA, C. M. R. Colorimetric determination of sulphamethoxazole in pharmaceutical preparations. **Indian Drugs**, Vijayawada, India, v. 132-135, oct. 1993.

RANGEL, Cássia de Fátima. Monitoramento de agrotóxicos em águas brutas e tratadas destinadas ao consumo humano, utilizando método multi-resíduo por EFS/CG-EM. 2008. 130 p. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente.), Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2008.

RAO G.P.; LU, C.; SU, F. Sorption of divalent metal ions from aqueous solution by carbon nanotubes: a review. **Sep Purif Technol**, Chandigarh India, v.58, p. 224-231, 2007

RASTOGI, L.; DASH, K.; BALLAL, A. Selective colorimetric/visual detection of Al<sup>3+</sup> in ground water using ascorbic acid capped gold nanoparticles. **Sens. Actuators B Chem**, Telangana, India, v. 248, p.124-132, mar. 2017.

REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; KRONKA, E. A. M. A análise química por injeção em fluxo contínuo. **Química Nova**, Piracicaba, São Paulo, v. 12, p. 82, set. 1996.

ROSARIO-CASTRO, B. I.; CONTÉS, E.J.; PÉREZ-DAVIS; CABRERA, C.R. Combined electron microscopy and spectroscopy characterization of as-received, acid purified, and oxidized HiPCO single-wall carbon nanotubes. **Materials Characterization**, San Juan, Puerto Rico, v. 60, p. 1442-1453, jul. 2009.

RODRIGUES, A. G. P.; LOPEZ, M. I. R.; ANGEL, T.; CASSILHAS, D, LEON, A. A.; MAHJOUB, O.; PRUSTY, A. K.; Monitoring of organochlorine pesticides in blood of women with uterine cervix cancer. **Environmental Pollution, Parte B**, Ariana, Tunisia, v. 220, p.853-862, oct. 2017.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis, **Analytical Chimica Acta**, Amsterdam, v. 78, p. 145-157, 1975.

RUZICKA, J.; STEWART, J. W. B.; ZAGATTO, E. A. G. Flow injection analysys : Part IV, Stream sample splitting and its application to the continuous spectrophotometric determination of chloride in brackish waters. **Analytical Chimica Acta**, Piracicaba, SP, v. 81, p. 387-396, aug. 1976.

SANTOS, V.M.R.; DONNICI, C.L.; COSTA, J.B.N.; CAIXEIRO, J.M.R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, Belo Horizonte, MG, v. 30, n.1, p. 159-170, nov. 2007.

SAMPAIO, L. O que são nanotubos de carbono? Agosto de 2009. Disponível em: <https://www.tecmundo.com.br/nanotecnologia/2640-o-que-sao-nanotubos-de-carbono-.htm>  
Acesso em: 22 de maio 2017.

SARMAH, A.K.; MEYER, M.T.; BOXALL, A.B.A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. **Chemosphere**, Hamilton, New Zealand, v. 65, p. 725-729, may 2006.

SCARPIGNATO, C.; PELOSINE, I. Rifaximin. A poorly absorbed antibiotic: pharmacology and clinical potential. **Chemotherapy**, Parma, Italy, v. 51, p. 36-66, 2005.

SCURTU, V.F.; MOTȚ, A. C.; SILAGHI-DUMITRESCU, R. Protein-Based Blood Substitutes: Recent Attempts at Controlling Pro-Oxidant Reactivity with and Beyond Hemoglobin. **Pharmaceuticals**, Cluj-Napoca, Romania, v. 6, p.867-880, mar. 2013.

SHAFFER, T. J.; MEYER, D. A.; CROFTON, K. M. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. **Environ. Health Perspect**, North Carolina, USA, v. 112, p.123-136, feb., 2005

SHAKULASHVILI, N.; STEINER, R.; ENGELHARDT, H., Simultaneous Determination of Various Classes of Pesticides Using Micellar Electrokinetic Cappillary Chromatography in Combination With Solid-Phase Extraction. **Chromatographia**, Tbilisi, Republic of Georgia, Springer, v. 60, p. 145-150, apr. 2004.

SHI, P.; YE, N. Investigation of the adsorption mechanism and preconcentration of sulfonamides using a porphyrin-functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-graphene oxide nanocomposite. **Talanta**, Beijing, China, Elsevier, v. 143 p. 219–225, oct. 2015.

SILVA, M. P. **Determinação de pesticidas organofosforados através de método enzimático**. Ano. 2011, Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas – SP, 2011. Disponível em: <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIC/248836>>. Acesso em: 13 abr. 2018.

SKEGGS, L. T. Jr. An automatic method for colorimetric analysis. **Amer. J. Clin. Pathol**, Cleveland, OH., v. 28, p.311-322, sept. 1957.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentals of analytical chemistry**. 7<sup>a</sup>. ed. Flórida: Sauders College Publishing, 1996.

SMERALDI, R. e MAY, P. **O reino do gado: uma nova fase na pecuarização da Amazônia Brasileira**. São Paulo: Amigos da Terra -Amazônia Brasileira, 2008.

SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. **J. Chromatogr. B.**, Geneva, Switzerland, v. 801, p. 141, nov. 2004.

SRIVASTAVA, S. Sorption of divalent metal ions from aqueous solution by oxidized carbon nanotubes and nanocages: A review. **Adv. Mater. Lett.**, Shijiazhuang, China v. 4, p. 2-8, mar. 2013.

SUN, Z.; TIAN, T.; GOU, M.; XU, X.; LI, Q.; WENG, H.A. A double film screening card for rapid detection of organophosphate and carbamate pesticide residues by and carbamate pesticide residues by one stepin vegetables and fruits. **Food Control**, Zhengzhou, China, v. 81, p. 23 – 29, 2017.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. parte 1: preparo e aplicações de MIP. **Química Nova**, São Paulo, Brasil, v. 28, p. 1076 -1086, dez. 2005.

TASIS, D.; TAGMATARCHIS, N.; BIANCO, A.; PRATO, M. Chemistry of carbon nanotubes. **Chemical Reviews**, Patras, Greece, v. 106, p. 1105-1136, mar. 2006.

TATSUMURA, S. Y. T. Alexander Fleming (1881-1955): Discoverer of penicillin. **Singapore Med. J.**, Singapore, v. 56, p. 366–367, jul. 2015.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamento experimentais, um tutorial. **Química Nova**, Campinas, São Paulo, v. 29, p. 338-350, abr. 2006.

TIWARI, J.N.; VIJ, V.; KEMP, K.C.; KIM, K.S. **Engineered carbon-nanomaterial-based electrochemical sensors for biomolecules**, Virginia, USA, ACS Nano 10, p. 46–80, jul. 2016.

TIWARI, N.; ASTHANA, A. A Catalytic Kinetic Spectrophotometric Determination of Organophosphorus Pesticides in Vegetable Samples. **J. Braz. Chem. Soc.**, Chhattisgarh, India, v. 23, No. 2, p. 322-327, dec. 2012.

TOÇOGLU, U.; HATIPOGLU, G. Electrochemical characterization os silicone/graphene/MWCNT hybrid lithium-ion battery anodes produced via rf magnetron sputtering. **Applied Surface Science**, v. 389, p. 507 – 513, dec.2016.

THOMPSON, T.S.; NOOT, D.K. Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.551, p. 168-176, aug. 2005.

TUPYNAMBÁ, M. L. V. C.; VIEIRA, E. C. Isolation of cassava leaf protein and determination of its nutritive value. **Nutrition Reports International**, London v. 19, n. 2, p. 249-259, jul.1979.

UEYAMA, J.; SAITO, I.; KAMIJIMA, M.; NAKAJIMA, T.; GOTOH, M.; SUZUKI, T.; SHIBATA, E.; KONDO, T.; TAJAGI, K.; MYAMOTO, K.; TAKAMATSU, J.; HASEGAWA, T.; TAKAGI, K., Simultaneous Determination of Urinary Dialkylphosphate Metabolites of Organophosphorus Pesticides using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Chromatography B.**, Nagoya, Japan, v. 823, p. 58-66, dec. 2006.

UNIÃO EUROPEIA. Comissão das Comunidades Europeias. **Decisão nº 2002/657/CE, de 12 de agosto de 2002.** Dá execução ao dispositivo na Diretiva 54 96/23/CE do Conselho relativa ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. Bruxelas: Jornal Oficial das Comunidades Europeias, 2002. p. 8-36.

21st International Conference on Flow Injection Analysis and Related Techniques Abstract book, St.-Petersburg, Russia, p.398–402, 2017.

VALE, J. A. Toxicokinetic and Toxicodynamic Aspects of Organophosphorous Insecticide Poisoning. **Toxicology Letters**, Birmingham, UK, v.102, p. 649-52, dec. 1998.

VEIGA, M.A.G. Estudo da eficiência de degradação da Isoniazida pelo processo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (UV) e identificação dos intermediários. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - UFRJ, Rio de Janeiro, 2011.

VELOSO, C.M.; DO CARMO RANGEL, M. Preparação de carbonos porosos por moldagem sequencial. **Quim. Nova**, Itapetinga, Bahia, v. 32, p. 2133-2141, ago. 2009.

XU, X.; XUA, X.; HANB, M.; QIUB, S.; HOUB, X. Development of a modified QuEChERS method based on magnetic multiwalled carbon nanotubes for the simultaneous determination of veterinary drugs, pesticides and mycotoxins in eggs by UPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, Chengdu, China, v. 276, p. 419-426, oct. 2019.

XIE, L.; GUO, J.; ZHAN, Y.; SHI, S. Efficient determination of protocatechuic acid in fruit juices by selective and rapid magnetic molecular imprinted solid phase extraction coupled with HPLC. **J Agric Food Chem**. Kaohsiung, Taiwan, v. 63, p. 8221- 8228, jul. 2014

YAKOBSON, B.; AVOURIS, P. **Mechanical Properties of Carbon Nanotubes**. Ed, Springer Berlin, Germany, p. 287-32, 2001.

YU, R.; LIU, Q.; LIU, J.; WANG, Q.; WANG, Y. Concentrations of organophosphorus pesticides in fresh vegetables and related human health risk assessment in Changchun, Northeast China. **Food Control**., Changchun, China, v. 60, p. 353–360, aug. 2016.

ZARBIN, A.J.G. Química de nanomateriais. **Química Nova**, Curitiba, Paraná, v. 30, n. 6, p. 1469-1479, jun. 2007.

ZHANG, J.; QING, Q. Effect of chemical oxidation on the structure of single-walled carbon nanotubes. **The Journal of Physical Chemistry B**., Kaifeng, China, v. 107, p. 3712-3718, feb. 2003.

ZHAO, H.; XUE, C.; NAN, T.; TAN, G.; Li, Z.; LI, Q. X.; WANG, B. Detection of copper ions using microcantilever immunosensors and enzyme-linked immunosorbent assay. **Analytica Chimica Acta**, Beijing, China, v. 676, p. 81-86, jul. 2010.

ZHAOWEI, S.; LIUYANG, T.; MIN, G.; XIAOTONG, X.; QIAN, H. W. - A double-film screening card rapid detection of organophosphate and carbamate pesticide residues by one step in vegetables and fruits. **Food Control**., Zhengzhou, China, v. 81, p. 23 -29, may 2017.

ZHONG, Z.; LI, G.; LUO, Z.; LIU, Z.; SHAO, Y.; HE, W.; DENG, J.; LUO, X. Carboxylated graphene oxide/polyvinyl chloride as solid-phase extraction sorbent combined with ion chromatography for the determination of sulfonamides in cosmetics. **Anal. Chim. Acta**., Guangzhou, China, v. 888, p. 75–84, jun.2015.

ZHOU, J.; CHEN, M.; DIAO, G. Calixarene sulfonates functionalized Reduced Graphene oxide with high supramolecular recognition capability: fabrication and application for enhanced host-guest electrochemical recognition. **J. Appl. Mater. Interfaces**, v. 5, p. 828-836, 2013.

ZHU, X.; SUN, J.; ZHANG, Y.; SUN, X. Immunization with functionalized carbon nanotubes enhances the antibody response against mode antigen ovalbumin. **Immunology Letter**, Jiangu,China, v. 178, p. 77-84, oct., 2016.

ZOETIS. Regulamento do Programa de Garantia da Zoetis Indústria de Produtos Veterinários LTDA. 29 de Janeiro de 2018. Disponível em: [www.zoetis.com.br](http://www.zoetis.com.br). Acesso em: 04 abr. 2018.

ZOTOU, A.; VASILIADOU, C. Selective determination of sulfonamide residues in honey by SPE-RP-LC with UV detection. **Chromatographia**, v. 64, p. 307-311, 2006.

ZHOU, W.; QUAN, J.H.; LEE1, Y.H.; SHIN, D.W.; CHA, G.H. Toxoplasma gondii Proliferation Require Down Regulation of Host Nox 4 Expression via Activation of PI3 Kinase /Akt Signaling Pathway. **Plos One**, Guangdong, China,v.8, p. , jun. 2013.

ZOU, Q.H.; WANG, J.; WANG, X.F.; LIU, Y.; HAN, J.; HOU, F.; XIE, M.X. Application of matrix solid-phase dispersion and high-performance liquid chromatography for determination of sulfonamides in honey. **Journal of AOAC International**, v.91, p. 252-258, 2008.

ZUIN V. G.; VILEGAS, J. H. Y. Pesticides Residues in Medicinal Plants and Phytomedicines. **Phytotherapy Research**, São Carlos, Brasil, John Wiley & Sons, v. 14, p. 73-88, sept., 2000.

ZHAO, H.; JI, X.; WANG, B.; WANG, N.; LI, X.; NI, R.; REN, J. An ultra-sensitive acetylcholinesterase biosensor based on reduced graphene oxide-Au nanoparticles- $\beta$ -cyclodextrin/Prussian blue-chitosan nanocomposites for organophosphorus pesticides detection. **Biosensors and Bioelectronics**, Shijiazhuang, China, v. 65, p.23 – 30, mar., 2015.

WALSH, C.; TIMOTHY, A. W. Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective. **Journal of Antibiotics**, Boston, MA, USA, Nature, v. 67, p. 7–22, jun., 2013.

WANG, J.; CAI, K. Preparation and thermoelectric properties of multi-walled carbon nanotubes/polypyrrole composites. **Synthetic Metals**, Shanghai,China, v.195, p. 132-136, sept., 2014.

WANG, P.; LUO, M.; LIU, D.; ZHAN, J.; LIU, X.; WANG, F.; ZHOU, Z. Application of magnetic graphene nanocomposite for organophosphorus pesticide extraction in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, Beijing, China, Elsevier, v.1535, p. 9-16, feb., 2018.

WANG, J.; MOU, Z.L.; DUAN, H.L.; MA, S.Y.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.Q. A Magnetic hiperbranched polyamide amine-based quick, easy cheap, effective, rugged and safe method for the detection of organophosphorus pesticide residues. **Journal of chromatography A**, China, v. 1585, p.202-206, jan. 2019.

WANG, X.H.; WANG, C.G.; WANG, Y.X.; LU, R.J.; QIN, J.J. Colossal permittivity of carbon nanotubes grafted carbon fiber-reinforced epoxy composites. **Mater. Lett.**, Jinan, China, v. 211, p. 273 – 276, jan. 2017.

WANG, Y.; WANG, L. C.; WAN, Q.H. Restricted Access magnetic materials prepared by dual surface modification for selective extraction of therapeutic drugs from biological fluids. **J. Magn. Mater.**, Jinan, China, Elsevier, v. 324, p. 410, feb. 2012.

WANG, YU.; WANG, Y.; CHEN, Q.; UONG, W. Restricted Access magnetic materials prepared by dual surface modification for selective extraction of therapeutic drugs from biological fluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, Tianjin, China, v. 324, p. 410-417, feb. 2012.

WARE G.; WHITANE, D. **The Pesticide Book**. 6. ed. Arizona, USA. Meister Publication, 2004.

WILLIAMS, P.L.; JAMES, R.C.; ROBERTS, S.M. Principles of Toxicology Environmental and Industrial Applications. **John Wiley & Sons Inc.**, New Jersey, USA, , 3<sup>a</sup> ed., 2014.

World Health Organization (WHO); *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, sixty-second meeting*, February, 2004. Safety for use (**Second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**). ... I. Antimicrobial preservatives and antioxidants, Rome, **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 1962 (out of print). .... 922, **2004**. ... of flavourings at the 73rd JECFA meeting (2010), Complete Table [xls 594 kb] Disponível em : <https://www.who.int/foodsafety/publications/jecfa-reports/en/> . Acessado em: 15 jan. 2017

WRIGHT, A. J. The Penicillins. **Mayo Clinic Proceedings**, Elsevier, v. 74, p. 290-307, mar., 1999

WU, W.J.; SHA, S.H.; SCHACHT, J. Recent advances in understanding aminoglycoside ototoxicity and its prevention. **Audiol Neurootol**, Mich., USA, v. 7, n. 3, p. 171 – 174, may, 2002.