

JULIANA APARECIDA DINIZ

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS DE
TRIAGEM PARA ANÁLISE DE MEDICAMENTOS
VETERINÁRIOS EM PRODUTOS DE ORIGEM BOVINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

D585d
2019
Diniz, Juliana Aparecida, 1989-
Desenvolvimento de métodos voltamétricos de triagem para
análise de medicamentos veterinários em produtos de origem
bovina / Juliana Aparecida Diniz. – Viçosa, MG, 2019.
xv, 109 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Leonardo Luiz Okummura.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Análise eletroquímica. 2. Ronidazol. 3. Fipronil.
4. Leite - Análise. 5. Carne de boi - Análise. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Química. Programa de
Pós-Graduação em Agroquímica. II. Título.

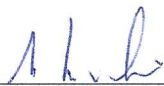
CDD 22. ed. 541.37

JULIANA APARECIDA DINIZ

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS DE
TRIAGEM PARA ANÁLISE DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS
EM PRODUTOS DE ORIGEM BOVINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de março de 2019.



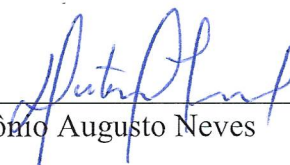
Marcelo Firmino de Oliveira



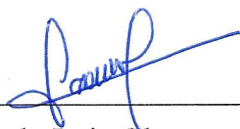
Edimar Aparecida Filomeno Fontes



Renata Pereira Lopes Moreira



Antônio Augusto Neves



Leonardo Luiz Okumura

(Orientador)

*À minha família, motivação
fundamental para esta conquista*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de estar aqui, pela saúde concedida e por todas as graças alcançadas.

Ao mestre Jesus, modelo e guia, por iluminar meu caminho e nunca me desamparar.

Aos meus pais, Mariusa e Juvenal, pelo apoio incondicional em todos os momentos, dedicação, carinho, pela força nos momentos difíceis e principalmente, por todo amor.

Ao meu grande amor, namorado, marido, amigo, parceiro, companheiro da vida, Pedro, por toda a força nos momentos difíceis, alegrias compartilhadas, felicidade diária, por todo seu amor.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Departamento de Química, pela oportunidade de realização do Doutorado.

Ao professor Leonardo, por acreditar em mim e pela oportunidade de integrar o GEAP, pela orientação, ensinamentos e confiança para desenvolver o projeto.

À professora Astrea pelas sugestões, ensinamentos e ajuda de sempre.

Ao professor Antônio Augusto (LAQUA) pelos conselhos.

Ao professor André Fernando (LAQUA), pela contribuição no teste estatístico.

A todos os amigos e familiares que sempre estiveram ao meu lado e aos novos amigos que conquistei durante este período, o meu muito obrigado!

Aos amigos do GEAP: Flávia, Priscila, Herbert, Meilene e Júnio. Sempre serei grata a cada um de vocês. Obrigada pelo companheirismo, pela harmonia, por me ajudarem em cada momento de dificuldade, ouvirem minhas lamentações, por sempre estarem por perto quando mais precisei. Essa conquista é nossa.

À CAPES pela bolsa que me foi concedida e também aos demais órgãos de fomento que possibilitaram a elaboração e execução deste projeto.

Por último, agradeço à minha filha, Maria Clara, que me move a cada dia querer mais, por nós duas. Obrigada por sempre entender nossa distância e me receber sempre com um sorriso quando volto pra casa. Obrigada por ser sempre tão madura. Eu te amo meu amor.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
CAPÍTULO 1.....	4
Medicamentos veterinários.....	5
Monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários.....	7
Antiparasitários utilizados em bovinos.....	7
Ronidazol (RNZ).....	8
Acaricidas utilizados em bovinos.....	10
Fipronil (FPN).....	11
Produção de carne e leite bovinos.....	13
Métodos eletroanalíticos.....	15
Voltametria cíclica.....	17
Voltametria de pulso diferencial.....	18
Voltametria de onda quadrada.....	20
Eletrodos de trabalho.....	20
Eletrodo de carbono vítreo.....	21
Eletrodo de pasta de carbono.....	22
Método voltamétrico de triagem.....	23
Referências Bibliográficas.....	25
CAPÍTULO 2.....	34
Resumo.....	35
Introdução.....	36
Material e métodos.....	39

Reagentes e solução estoque de RNZ.....	39
Obtenção das amostras e preparo do extrato de carne bovina	40
Instrumentação	40
Avaliação do comportamento voltamétrico de RNZ.....	41
Otimização das condições de análise para RNZ	41
Validação do método e aplicação em amostras de carne bovina	42
Resultados e discussão	43
Comportamento voltamétrico de RNZ	43
Proposta de mecanismo para a redução de RNZ em GCE	47
Ajuste do eletrólito de suporte por DPV	48
Otimização instrumental para DPV e SWV	51
Determinação de RNZ em extrato de carne bovina e validação do método.....	55
Curvas analíticas.....	55
Linearidade.....	57
Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	58
Precisão	59
Exatidão	60
Conclusão	62
Referências Bibliográficas	63
CAPÍTULO 3	69
Resumo.....	70
Introdução.....	71
Material e métodos.....	74
Reagentes e solução estoque de FPN	74
Amostras de leite.....	75
Instrumentação	75
Avaliação do comportamento voltamétrico de FPN	75
Otimização das condições de análise para FPN.....	76
Validação do método e aplicação em amostras de leite UHT desnatado, zero lactose	77
Resultados e discussão	78
Comportamento voltamétrico de FPN.....	78
Ajuste do eletrólito de suporte	82
Ajuste do eletrodo de trabalho e composição da pasta de carbono.....	86
Otimização instrumental para DPV e SWV	88

Determinação de FPN em leite UHT desnatado, zero lactose e validação do método	92
Curvas analíticas.....	92
Limites de detecção e quantificação	94
Linearidade.....	95
Precisão	96
Exatidão	97
Seletividade e análise de interferentes	99
Conclusão	101
Referências Bibliográficas	103
3. CONCLUSÃO GERAL	109

LISTA DE ABREVIATURAS

α_0 : espécie protonada

α_1 : espécie desprotonada

CPE: eletrodo de pasta de carbono

CV: coeficiente de variação

DPV: voltametria de Pulso Diferencial

E_p : potencial de pico

E_{pa} : potencial de pico anódico

E_{pc} : potencial de pico catódico

F: constante de Faraday

GCE: eletrodo de carbono vítreo

GC/ECD: cromatografia gasosa acoplada à detector de captura de elétrons

GC/ECD-MS: cromatografia gasosa com espectrômetro de massas e detecção por captura de elétrons

GC/MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas

GC/NPD: cromatografia gasosa acoplada à detector de nitrogênio-fósforo

GPES: sistema eletroquímico de propósito geral

HDME: eletrodo de gota pendente de mercúrio

HPLC- MS/MS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

HPLC/UV: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detector de ultravioleta

IDA: Ingestão diária aceitável

I_p : corrente de pico

I_{pa} : corrente de pico anódico

I_{pc} : corrente de pico catódico

LC-APCI-MS/MS: cromatografia Líquida com Fonte de Ionização Química a pressão atmosférica acoplada a Espectrespectrômetro de massas

LC- MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

LC-UV: cromatografia líquida acoplada à detector de ultravioleta

LC/UV/MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrômetro de massas com detector de ultravioleta

LD: limite de detecção

LMR: Limite máximo de resíduos
LQ: limite de quantificação
n: número de elétrons envolvidos no processo de oxirredução
OH: grupo hidroxila
PA: grau analítico de pureza; analytical grade of purity
PGE: eletrodo de grafite pirolítico
pH: potencial hidrogeniônico
pK_a: logaritmo negativo da constante de acidez
PNCRC: Plano nacional de controle de resíduos e contaminantes
QuEChERS: “Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe method”
R: constante universal dos gases
RP-HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
S_b: desvio padrão das medidas do branco
SWV: Voltametria de Onda Quadrada; Square Wave Voltammetry
T: temperatura absoluta (K)
UHPLC- MS/MS: cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrômetro de massas
UPLC-MS/MS: cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrômetro de massas
VC: Voltametria Cíclica
W_{1/2} – largura de pico à meia altura

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1. Distribuição de faturamento nacional de medicamentos veterinários por (A) classe terapêutica e (B) espécie animal.....6
- Figura 2. Estrutura química de ronidazol.....9
- Figura 3. Estrutura molecular de fipronil.....12
- Figure 4. Mapas referentes (A) ao número efetivo de bovinos e bovinos abatidos e (B) ao leite produzido em litros no Brasil.....14
- Figura 5. A) Forma de aplicação do potencial de varredura em VC; B) sinal voltamétrico registrado para um sistema tipicamente reversível em VC; C) sinal voltamétrico registrado para um sistema quase reversível em VC; D) sinal voltamétrico registrado para um sistema irreversível em VC.....18
- Figura 6. A) forma de aplicação do pulso de potencial em DPV; B) sinal voltamétrico registrado para DPV.....19
- Figura 7. A) forma de aplicação do pulso de potencial em SWV; B) sinal voltamétrico registrado para SWV.....20
- Figura 8. A) Modelo estrutural e B) microscopia eletrônica de alta eficiência para o carbono vítreo.....22
- Figura 9. Relatório de artigos publicados referentes aos termos de busca “screening method and voltammetry”, no período de 2008 a julho de 2019.....23

CAPÍTULO 2

- Figura 1. Fórmula estrutural do antiparasitário ronidazol (RNZ).....37
- Figura 2. Preparo do extrato contendo a matriz carne bovina.....40
- Figura 3. (A) Voltamograma cíclico do (a -)branco e (b -) solução de RNZ 2,00 mmol L⁻¹; (B) Voltamogramas cíclicos sucessivos de solução aquosa de RNZ 2,00 mmol L⁻¹: (a -) 1º ciclo; (b -) 2º ciclo; (c -) 3º ciclo; (d -) 5º ciclo; (e -) 10º ciclo, em velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹ com tampão fosfato 0,100 mol L⁻¹ pH 6,5 e eletrodo de carbono vítreo.....44
- Figura 4. (A) Intensidade da corrente de pico catódico (I_{pc}) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$); (B) Dependência da função corrente (I_{pc} / $v^{1/2}$) com a velocidade de varredura de potencial; (C) Variação do logaritmo da corrente de pico catódico em função do logaritmo da velocidade de varredura em VC para uma solução de RNZ 2,00 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,100 mol L⁻¹ em pH 6,5 e GCE.....46
- Figura 5. Proposta de mecanismo para redução eletroquímica de RNZ em GCE.....48

Figura 6. Diagrama de distribuição de espécie para o RNZ; α_0 é o grau de dissociação da espécies protonada.....	49
Figura 7. (A) Variação de $W_{1/2}$ e I_{pc} em diferentes eletrólitos suportes KOH 0,100 mol L ⁻¹ , KCl 0,100 mol L ⁻¹ e tampão fosfato 0,100 mol L ⁻¹ pH 6,5 e (B) Variação de E_{pc} e I_{pc} em diferentes eletrólitos suportes KOH 0,100 mol L ⁻¹ , KCl 0,100 mol L ⁻¹ e tampão fosfato 0,100 mol L ⁻¹ pH 6,5.....	50
Figura 8. Voltamogramas de pulso diferencial de solução aquosa de RNZ 2,00 mmol L ⁻¹ com eletrodo de carbono vítreo usando (a -) KOH 0,100 mol L ⁻¹ ; (b -) KCl 0,100 mol L ⁻¹ ; (c -) tampão fosfato 0,100 mol L ⁻¹ pH 6,5 como eletrólitos de suporte.....	51
Figura 9. Variação de I_{pc} e largura de pico a meia altura ($W_{1/2}$) em função de (A) velocidade de varredura, (B) amplitude de pulso e (C) tempo de pulso por DPV para solução de RNZ 2,00 mmol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,100 mol L ⁻¹ pH 6,5 como eletrólito de suporte.....	52
Figura 10. Variação de I_{pc} e largura de pico a meia altura ($W_{1/2}$) em função de (A) frequência de varredura, (B) amplitude de pulso e (C) incremento de varredura por SWV para solução de RNZ 2,00 mmol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,100 mol L ⁻¹ pH 6,5 como eletrólito de suporte.....	53
Figura 11. Comparação entre as técnicas (a -) SWV e (b -) DPV após otimização dos parâmetros experimentais, para solução aquosa de RNZ 2,00 mmol L ⁻¹ com tampão fosfato 0,100 mol L ⁻¹ pH 6,5 como eletrólito de suporte.....	55
Figura 12. Curvas analíticas para determinação de RNZ na (A) ausência e (B) presença de matriz e efeitos da concentração de analito na relação entre I_{pc} e E_{pc} : (a) 0,625 mg kg ⁻¹ ; (b) 1,250 mg kg ⁻¹ ; (c) 1,875 mg kg ⁻¹ ; (d) 2,500 mg kg ⁻¹ ; (e) 3,125 mg kg ⁻¹ ; (f) 3,750 mg kg ⁻¹ e (g) 4,375 mg kg ⁻¹ . Condições: GCE com o tampão de fosfato 0,100 mol L ⁻¹ em pH 6,5 como eletrólito de suporte.....	56
Figura 13. Comparação das curvas analíticas obtidas para determinação de RNZ (a) na ausência de matriz e (b) com carne bovina.....	57
Figura 14. Gráfico de resíduos dos ajustes das respostas instrumentais I_{pc} em função da concentração para a curva analítica construída para quantificação de RNZ na (A) ausência e (B) presença de carne bovina.....	58
Figura 15. Relações voltamétricas entre I_{pc} e diferentes concentrações de carne bovina para fortificações de FPN em (A) 0,625 mg kg ⁻¹ ; (B) 2,500 mg kg ⁻¹ e (C) 3,750 mg kg ⁻¹	61

CAPÍTULO 3

Figura 1. Fórmula estrutural do carrapaticida fipronil (FPN).....	71
Figura 2. A) Voltamogramas cíclicos do (a -) branco e (b -) solução FPN 0,400 mmol L ⁻¹ em solução de NaOH 0,100 mol L ⁻¹ preparada em etanol-água 30% (v/v). B) Voltamogramas em ciclos sucessivos: (a -) 1° ciclo; (b -) 2° ciclo; (c -) 3° ciclo; (d -) 5° ciclo; (e -) 10° ciclo. ($v = 100 \text{ mV s}^{-1}$).....	79

Figura 3. (A) Intensidade da corrente de pico catódico (I_{pa}) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$); (B) Dependência da função corrente ($I_{pa} / v^{1/2}$) com a velocidade de varredura de potencial; (C) Variação do logaritmo de I_{pa} em função do logaritmo da velocidade de varredura em VC para uma solução de FPN 0,400 mmol L⁻¹ em solução de NaOH 0,100 mol L⁻¹ preparada em etanol-água 30% (v/v e CPE.....81

Figura 4. A) Voltamogramas cíclicos de solução aquosa de FPN 0,400 mmol L⁻¹ com CPE usando (a -) NaOH 0,100 mol L⁻¹; (b -) KOH 0,100 mol L⁻¹; (c -) tampão fosfato 0,100 mol L⁻¹ em pH 12,0; (d -) tampão BR em pH 11,00 (e -) tampão BR em pH 10,00; (f -) tampão BR em pH 9,00; (g -) tampão BR em pH 8,00 e (h -) tampão BR em pH 6,00 como eletrólitos de suporte . B) Variação de I_{pa} e E_{pa} entre os eletrólitos: (a) NaOH 0,100 mol L⁻¹; (b) KOH 0,100 mol L⁻¹; (c) tampão fosfato 0,100 mol L⁻¹ em pH 12,0; (d) tampão BR em pH 11,00 (e) tampão BR em pH 10,00; (f) tampão BR em pH 9,00; (g) tampão BR em pH 8,00.....83

Figura 5. Proposta de mecanismo para a baixa solubilidade em valores de pH menor que 6,0 e para a Oxidação de FPN em CPE.....85

Figura 6. A) Médias e desvios padrão dos valores de I_{pa} para FPN 0,400 mmol L⁻¹ em solução de NaOH 0,100 mol L⁻¹ preparada em solução etanol-água 30% (v/v) por voltametria cíclica com os eletrodos de carbono vítreo (CV), pasta de carbono (CPE) e de grafite pirolítico (PGE). B) Modificações do eletrodo e pasta de carbono (a -) pó de grafite/óleo mineral na proporção 70:30 (%m/m); (b -) pó de grafite/óleo mineral na proporção 75:25 (%m/m); (c -) pó de grafite/óleo mineral/líquido iônico na proporção 70:20:10 (%m/m); (d -) pó de grafite/óleo mineral na proporção 80:20 (%m/m); (e -) pó de grafite/óleo mineral /líquido iônico na proporção 70:15:15 (%m/m); (f -) pó de grafite/óleo mineral na proporção 70:15:15 (%m/m); (g -) pó de grafite/óleo mineral/grafeno na proporção 70:10:20 (%m/m) e (h -) pó de grafite/óleo mineral/nanotubos de carbono/líquido iônico na proporção 65:5:15:15 (%m/m).....87

Figura 7. Variação de I_{pc} e largura de pico a meia altura ($W_{1/2}$) em função de (A) velocidade de varredura, (B) amplitude de pulso e (C) tempo de pulso por DPV para solução de 30% FPN 0,400 mmol L⁻¹ em solução de NaOH 0,100 mol L⁻¹ preparada em solução etanol-água (v/v).....89

Figura 8. Variação de I_{pc} e largura de pico a meia altura ($W_{1/2}$) em função de (A) frequência de varredura, (B) amplitude de pulso e (C) incremento de varredura por SWV para solução de para FPN 0,400 mmol L⁻¹ em solução de NaOH 0,100 mol L⁻¹ preparada em solução etanol-água 30% (v/v).....90

Figura 9. Voltamogramas obtidos sob as melhores condições em (a -) DPV e (b -) SWV para uma solução de FPN 0,400 mmol L⁻¹ em solução de NaOH 0,100 mol L⁻¹ preparada em solução etanol-água 30% (v/v).....92

Figura 10. Curvas analíticas na (A) ausência e (B) presença de matriz e efeitos da concentração de analito na relação entre I_{pa} e E_{pa} : (a) 2,0 mg L⁻¹; (b) 4,0 mg L⁻¹; (c) 6,0 mg L⁻¹; (d) 8,0 mg L⁻¹; (e) 10,0 mg L⁻¹; (f) 12,0 mg L⁻¹; (g) 14,0 mg L⁻¹ e (h) 16,0 mg L⁻¹ mg L⁻¹). Condições: CPE com NaOH 0,100 mol L⁻¹ preparada em solução etanol-água 30% (v/v) como eletrólito de suporte.....93

Figura 11. Comparação entre curvas analíticas obtidas na (a -) ausência de matriz e (b -) em leite.....94

Figura 12. Gráfico de resíduos do ajuste das respostas instrumentais I_{pa} , em função da concentração para a curva analítica construída para quantificar FPN na ausência (A) e presença de matriz (B).....	96
Figura 13. Relações voltamétricas entre I_{pa} e diferentes concentrações de leite UHT desnatado, zero lactose para fortificações de FPN em (A) 4,00 mg L ⁻¹ ; (B) 10,00 mg L ⁻¹ e (C) 14,0 mg L ⁻¹	100
Figura 14. Variação de I_{pa} sobre as análises de: (A) (a) FPN 10,00 mg L ⁻¹ , (b) FPN 10,00 mg L ⁻¹ e Ca ²⁺ 100 mg L ⁻¹ ; (c) FPN 10,00 mg L ⁻¹ e Ca ²⁺ 500 mg L ⁻¹ (d) FPN 10,00 mg L ⁻¹ e Ca ²⁺ 1 g L ⁻¹ (B) (a) FPN 10,00 mg L ⁻¹ , (b) FPN 10,00 mg L ⁻¹ e lactose 100 mg L ⁻¹ ; (c) FPN 10,00 mg L ⁻¹ e lactose 500 mg L ⁻¹ (d) FPN 10,00 mg L ⁻¹ e lactose 1 g L ⁻¹	100
Figura 15. Estrutura proposta para o complexo de cálcio coordenado à fipronil.....	101

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Propriedades físicas e químicas de FPN.....	12
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Métodos analíticos empregados para análise de RNZ.....	38
Tabela 2. Parâmetros voltamétricos de DPV e SWV ajustados para análise de RNZ.....	54
Tabela 3. Modelos de regressão linear ajustados para obtenção das curvas analíticas para quantificar RNZ por DPV.....	57
Tabela 4. Limites de detecção e quantificação e outros parâmetros analíticos.....	59
Tabela 5. Resultados dos ensaios de recuperação para diferentes concentrações de RNZ.....	62

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Métodos analíticos empregados para análise de FPN.....	73
Tabela 2. Parâmetros voltamétricos de DPV e SWV ajustados para análise de FPN.....	91
Tabela 3. Equações das curvas analíticas para determinação quantitativa de FPN na ausência e presença de matriz.....	93
Tabela 4. Limites de detecção e quantificação para análise de FPN.....	95
Tabela 5. Resultados dos ensaios de recuperação e precisão para diferentes concentrações de FPN adicionadas em amostras de leite UHT desnatado, zero lactose.....	99

RESUMO

DINIZ, Juliana Aparecida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2019. **Desenvolvimento de métodos voltamétricos de triagem para análise de medicamentos veterinários em produtos de origem bovina.** Orientador: Leonardo Luiz Okumura.

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de duas metodologias voltamétricas inéditas de triagem e aplicação na análise de ronidazol (RNZ) em carne bovina e fipronil (FPN) em leite. Para análise de RNZ foi utilizado eletrodo de carbono vítreo (GCE) como eletrodo de trabalho e tampão fosfato pH 6,5 ($0,100 \text{ mol L}^{-1}$) como eletrólito de suporte. A caracterização por voltametria cíclica indicou um pico catódico irreversível em $E_{pc} = -0,740 \text{ V}$ (vs. $\text{Ag|AgCl, KCl}_{\text{sat.}} 3,0 \text{ mol L}^{-1}$). O método foi aplicado e validado por voltametria de pulso diferencial (DPV) para análise de extrato de carne bovina, sendo obtidas taxas de recuperação para três concentrações de RNZ ($0,625 \text{ mg kg}^{-1}$; $2,500 \text{ mg kg}^{-1}$; $3,750 \text{ mg kg}^{-1}$) variando de 99,3% a 100,3%. Foram obtidos limites de detecção (LD) $0,062 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,107 \text{ mg kg}^{-1}$ e quantificação (LQ) de $0,207 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,358 \text{ mg kg}^{-1}$ respectivamente e valores de repetitividade satisfatórios para aplicação do método. Para o estudo do processo de oxirredução de FPN as melhores condições de trabalho foram então obtidas em meio de $\text{NaOH } 0,100 \text{ mol L}^{-1}$ preparada em solução etanol-água 30% (v/v) como eletrólito de suporte e com eletrodo de pasta de carbono sem modificações. Neste caso, foi observado um processo anódico irreversível em $E_{pa} = +0,700 \text{ V}$ (vs. $\text{Ag|AgCl, KCl}_{\text{sat.}} 3,0 \text{ mol L}^{-1}$). A quantificação também foi realizada por voltametria de pulso diferencial (DPV). O método foi aplicado e validado para análise de leite UHT desnatado, zero lactose. A taxa de recuperação obtida para três concentrações de FPN ($4,000 \text{ mg L}^{-1}$; $10,00 \text{ mg L}^{-1}$; $14,00 \text{ mg L}^{-1}$) variou entre 95,3% e 109% na matriz. Foram obtidos limites de detecção (LD) $0,568 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,331 \text{ mg L}^{-1}$ e de quantificação (LQ) $1,89 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,10 \text{ mg L}^{-1}$ na ausência de matriz e em leite, respectivamente e valores de repetitividade satisfatórios para aplicação do método. As aplicações dos métodos em amostras autênticas se apresentou satisfatória para triagem de resíduos de medicamentos veterinários em carne e leite bovino.

ABSTRACT

DINIZ, Juliana Aparecida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2019. **Development of voltammetric screening methods for the analysis of veterinary drugs in products of bovine origin.** Adviser: Leonardo Luiz Okumura.

The objective of this study was the development of two unprecedented voltammetric methods of screening and the application of these methods for the analysis of ronidazole (RNZ) in bovine meat and fipronil (FPN) in milk. For the analysis of RNZ, a glassy carbon electrode (GCE) was used as working electrode and phosphate buffer pH 6.5 0.100 mol L⁻¹ as support electrolyte. Under these conditions the cyclic voltammetry characterization indicated an irreversible cathodic peak at approximately -0.740 V (vs. Ag | AgCl, KCl_{sat.} 3,0 mol L⁻¹). The method was applied and validated for bovine meat analysis, obtaining recovery rates for three concentrations of RNZ (0.625 mg kg⁻¹; 2.500 mg kg⁻¹; 3.750 mg kg⁻¹) ranging from 99.3% and 100.3%. Limit of Detection (LOD) 0.062 mg kg⁻¹ and 0.107 mg kg⁻¹ and quantification (LOQ) of 0.207 mg kg⁻¹ and 0.358 mg kg⁻¹ respectively and satisfactory repeatability values were obtained for the application of the method. The oxidation process for FPN was studied using a carbon paste electrode (CPE). Different graphite powder compositions and electrode modifiers were evaluated, as well as different support electrolytes and pH's for the detection of FPN. The best working conditions were then obtained in NaOH medium 0.100 mol L⁻¹ prepared in 30% ethanol / water solution (v / v) as support electrolyte and with carbon paste electrode without modifications. An irreversible anodic process was observed at approximately +0,700 V (vs. Ag | AgCl, KCl_{sat.} 3,0 mol L⁻¹). Quantification was also performed by differential pulse voltammetry (DPV). The method was applied and validated for analysis of skimmed UHT milk, zero lactose. The recovery rate obtained for three FPN concentrations (4.000 mg L⁻¹; 10.00 mg L⁻¹; 14.00 mg L⁻¹) ranged from 95.3% to 109% in the matrix. Limits of detection (LOD) 0.568 mg L⁻¹ and 0.331 mg L⁻¹ and of quantification (LOQ) 1.89 mg L⁻¹ and 1.10 mg L⁻¹ were obtained in the absence of matrix and in milk respectively and satisfactory repeatability values for method application. The applications of the methods in authentic samples were satisfactory for the sorting of residues of veterinary drugs in meat and bovine milk.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As projeções populacionais indicam crescimento acelerado e contínuo nas próximas décadas. Estima-se que a população mundial em 2024 será superior a oito bilhões de pessoas e, em 2050, superior a nove bilhões (ONU, 2017).

O aumento da população aliado á mudanças associadas á dietas e combinado com o aumento da renda média mundial e da urbanização poderá resultar em quase o dobro da demanda por alimentos (Gjedrem *et al.*, 2012).

A produção mundial de carne deve dobrar até 2050 e a produção de leite deverá aumentar 23% até 2028, sendo a maior parte esperada nos países em desenvolvimento. O crescente mercado de carne oferece uma oportunidade significativa para pecuaristas. No entanto, o aumento da produção pecuária segura, representa um grande desafio (FAO, 2019) (MAPA, 2018).

Ocorre mundialmente uma tendência crescente de consumidores à procura de alimentos seguros, livres de resíduos e contaminantes, tendo em vista que a garantia de alimento é essencial para a prevenção de doenças (Santos *et al.*, 2002). Além disso, a presença destes resíduos pode causar descrédito à cadeia produtiva. Dessa forma, o monitoramento destes produtos torna-se de fundamental importância.

Fipronil (FPN) e Ronidazol (RNZ) são medicamentos veterinários utilizados em bovinos para o controle do “carrapato do boi” (*Rhipicephalus microplus*) e do protozoário *Tritrichomonas foetus*, respectivamente. Ambos se utilizados de forma indevida ou acima da dose permitida, podem deixar resíduos em alimentos de origem bovina, como a carne e o leite.

Tradicionalmente, a análise de resíduos de medicamentos veterinários é realizadas utilizando técnicas cromatográficas, que são técnicas muito importantes em análises químicas devido à algumas vantagens como por exemplo a facilidade em identificar e quantificar as espécies presentes nas amostras por meio de detectores específicos. Contudo, tais técnicas dependem de um longo tempo nas etapas iniciais para preparação das amostras, utilizam maior quantidade de reagentes e a instrumentação geralmente é mais dispendiosa financeiramente, o que eleva o custo final das análises (Galli *et al.*, 2006).

Assim sendo, há necessidade de se desenvolver métodos mais simples, rápidos, de baixo custo e que permitam o monitoramento destes produtos.

As técnicas voltamétricas relacionam medidas de quantidades elétricas, tais como, corrente, potencial e carga, com parâmetros químicos. Estas apresentam algumas vantagens frente às técnicas tradicionais de análise, a principal delas é a possibilidade, em diversos casos, de análise direta da amostra, sem necessidade de etapas de separação ou pré-tratamento da mesma, o que possibilita a análise in loco de resíduos em alimentos (Galli *et al.*, 2006; Pacheco *et al.*, 2013).

Devido às vantagens apresentadas, as técnicas voltamétricas se apresentam como ótima alternativa para desenvolvimento de método de triagem de medicamentos veterinários em alimentos de origem bovina

Destarte, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de duas metodologias eletroanalíticas de triagem simples, rápidos, eficientes e de baixo custo que possam ser aplicados à determinação e quantificação de ronidazol (RNZ) e fipronil (FPN) em carne e leite bovino, respectivamente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Propor duas metodologias eletroanalíticas de triagem utilizando técnicas voltamétricas para determinação e quantificação de resíduos de medicamentos veterinários em carne e leite bovino.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar os processos de oxirredução para os compostos RNZ e FPN em eletrodo de carbono vítreo e eletrodo de pasta de carbono;
- Escolher condições ideais para análise, tais como: eletrólito de suporte, pH do sistema, composição do eletrodo de trabalho e variáveis das técnicas voltamétricas;
- Avaliar os comportamentos voltamétricos dos compostos quanto ao transporte de massa e reversibilidade e propor mecanismos dos processos de oxirredução;
- Validação dos métodos propostos via análise de figuras de mérito para RNZ e FPN.

CAPÍTULO 1

Revisão de Literatura

Medicamentos veterinários

De acordo com o Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet) medicamentos veterinários são definidos como toda e qualquer substância que se aplica ou se administra a qualquer animal destinado à produção de alimentos, como os que produzem carne ou leite, as aves de granja, peixes ou abelhas, tanto com fins terapêuticos, profiláticos ou de diagnóstico, ou para modificar as funções fisiológicas, de comportamento ou como promotor de crescimento (ANVISA, 2003).

Incluem-se como produtos de uso veterinário medicamentos, vacinas, pesticidas, melhoradores da produção animal, entre outros. Tais produtos definem-se como substância química, biológica, biotecnológica ou preparações manufaturadas destinadas à prevenção, ao diagnóstico, à cura ou ao tratamento das doenças dos animais. A aplicação desses produtos pode ocorrer de forma individual ou coletiva e também pode ser efetuada de forma direta ou misturada com os alimentos (MAPA, 2019), no entanto, a maioria dos medicamentos veterinários é administrada como aditivos alimentares ou dissolvidos na água de consumo oferecida aos animais (Aerts *et al.*1995).

De acordo com a legislação brasileira (MAPA, 2012) os medicamentos de uso veterinários estão classificados em: medicamentos de referência, medicamento similar e medicamento genérico. Define-se ao medicamento de referência aquele inovador registrado no órgão federal competente e comercializado no país, cuja eficácia, segurança e qualidade foram comprovadas cientificamente nesse órgão. São medicamentos similares àqueles que contêm o mesmo princípio ativo do medicamento de referência, mesma concentração e forma farmacêutica, mas cujos excipientes podem ou não ser idênticos. Os medicamentos genéricos são os que contêm os mesmos princípios ativos do medicamento de referência, com a mesma concentração, forma farmacêutica, podendo diferir apenas em características relativas ao tamanho, formato, prazo de validade, embalagem, rotulagem, excipientes e veículos do produto.

A indústria de produtos para saúde animal fechou 2017 com faturamento global em torno de US\$ 34 bilhões, resultado 6% superior á 2016 (US\$ 32 bilhões), o que confirma as expectativas de crescimento do negócio acima da média da economia global. Analistas apostam que o mercado possa atingir US\$ 40 bilhões em

2020. No Brasil, o mercado de produtos para saúde animal movimentou R\$ 5,34 bilhões em 2017. Resultado que representa evolução de 8% sobre 2016 e dá ao Brasil cerca de 5% do mercado global de produtos veterinários (SINDAN, 2017).

Na Figura 1 estão representadas as distribuições do faturamento nacional em 2017 por (A) classe terapêutica e (B) espécie animal. Conforme observado, o país obteve maior faturamento com a classe de antiparasitários e com medicamentos destinados à ruminantes (SINDAN, 2017).

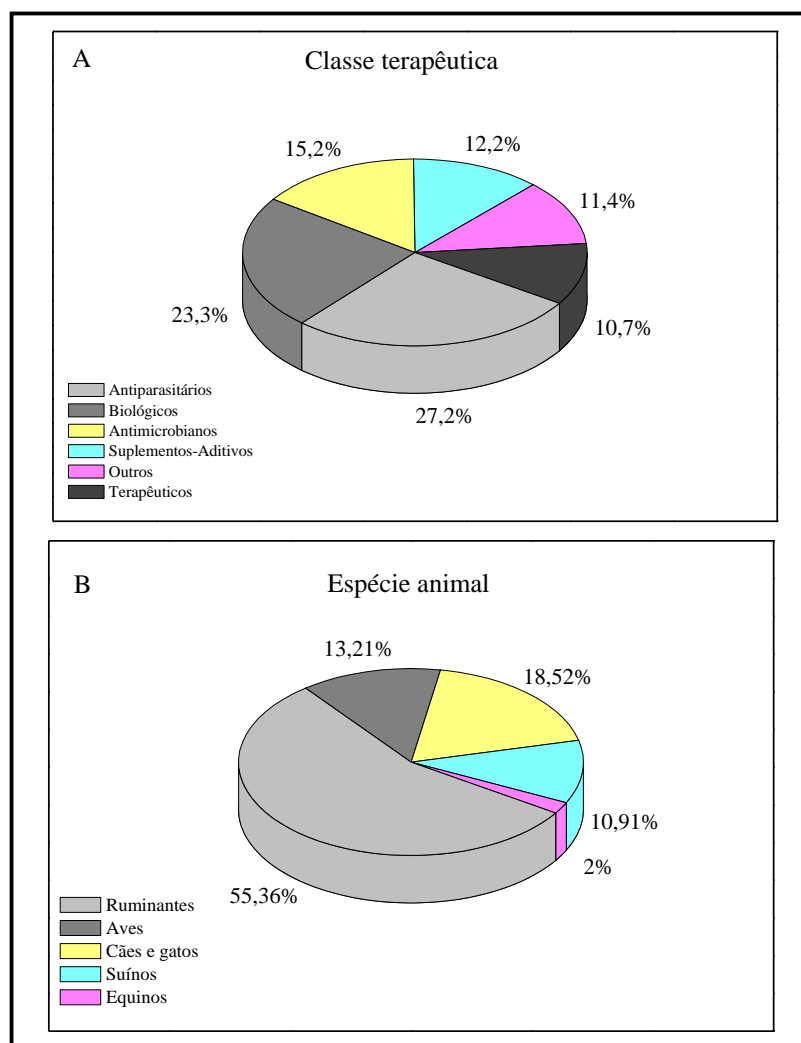


Figura 1. Distribuição de faturamento nacional de medicamentos veterinários por (A) classe terapêutica e (B) espécie animal

Fonte: Adaptado de Sindan (2017)

Tendo em vista a quantidade de medicamentos veterinários utilizados em bovinos e sabendo a enorme importância da bovinocultura para a economia do país, além das preocupações com a saúde humana e ambiental, fica evidente a importância

do desenvolvimento de metodologias de determinação de resíduos de medicamentos veterinários nos produtos alimentícios de origem bovina.

Monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários

Define-se resíduos como substâncias (de natureza química ou biológica) indesejáveis presentes em pequenas quantidades nos produtos de origem animal.

Ao considerar os animais de produção, os resíduos de medicamentos veterinários são um atributo de grande importância na indústria veterinária. A permanência de resíduos de medicamentos nos derivados de carne e leite é um dos principais limitantes para a comercialização e viabilização de produtos empregados na criação de animais de produção (Barbosa, 2017).

Os resíduos podem ser introduzidos na cadeia alimentar por decorrência de diferentes práticas, como por exemplo armazenamento incorreto de alimentos ou também podem ser resultado de medicamentos fornecidos aos animais (Biswas *et al.*, 2010).

Com o intuito de verificar o uso correto e seguro dos medicamentos veterinários, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu em 1986 e adequou em 1995, o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC) (MAPA, 1999) que inclui programas setoriais para análise de carne, leite, ovos, mel e pescado. Em complemento as ações já desenvolvidas pelo MAPA, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável por controlar e fiscalizar resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. Para operacionalizar sua competência legal, foi instituído oficialmente o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) , com o objetivo geral de subsidiar a análise de risco do uso de medicamentos veterinários em animais de produção, visando fortalecer os mecanismos de controle sanitário (ANVISA, 2003).

Antiparasitários utilizados em bovinos

A presença de parasitos em bovinos pode levar à grandes perdas econômicas devido à queda de produtividade e transmissão de patógenos, em algumas vezes,

ocasionando a morte de alguns animais, por isso, há grande importância do controle dos mesmos. Na maioria das vezes, realizam-se tentativas de combate aos parasitos de forma incorreta com uso excessivo e desordenado das bases terapêuticas, o que aumentam o custo de produção e ainda não alcançam os objetivos de controle. Além disso, implicam na presença de resíduos nos produtos de origem animal (Delgado *et al.*, 2009).

Os antiparasitários são fármacos utilizados para o controle dos parasitas internos (endoparasitas) ou externos (ectoparasitas) dos animais. Esse produto veterinário é classificado em anti-helmínticos (tratamento ou prevenção das helmintoses); anticoccidianos (tratamento da coccidiose); bernicidas (tratamento ou prevenção do berne); carrapaticidas (tratamento ou prevenção dos carrapatos); hemoparasiticidas (tratamento das hemoparasitose); mata-bicheiras (tratamento ou prevenção das bicheiras); mosquicidas (controle ou prevenção das moscas); piolhidas (controle dos piolhos); sarnicidas (tratamento ou controle das sarna) e pulguicidas (controle das pulgas) (MAPA 2015).

Ronidazol (RNZ)

Nitroimidazóis são uma classe de medicamentos veterinários utilizados para o tratamento e prevenção de certas doenças bacterianas e protozoárias em aves domésticas, disenteria suína e tricomonose genital em bovinos (Granja *et al.*, 2013).

A tricomonose é uma doença parasitária, infecciosa e sexualmente transmissível entre os bovinos. Essa doença é causada por um protozoário flagelado parasita, patógeno venéreo de gado, denominado *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928) (Gookin *et al.*, 2006), que é ativamente móvel, anaeróbico e se multiplica por divisão binária. É sensível ao calor e aos desinfetantes comuns. *Tritrichomonas foetus* sobrevive por poucos dias no ambiente.

Tritrichomonas foetus tem distribuição mundial e pode ocorrer em qualquer região onde existam bovinos tanto de corte quanto para produção de leite. A importância dessa enfermidade é avaliada pelos problemas reprodutivos que pode causar e conseqüentemente pelas perdas econômicas relacionadas com os custos de tratamento das conseqüências de aborto e piometra, pela necessidade de descarte de reprodutores e pela diminuição na produção por repetição de cios e abortos. Em fêmeas a doença se caracteriza por causar principalmente endometrite, piometra,

cervicite, vaginite, irregularidades do cio, abortamento precoce e esterilidade temporária. Os machos têm uma infecção assintomática, não desenvolvem a doença e nem adquirem imunidade contra o parasita. O modo de transmissão natural ocorre durante o coito, onde o parasita passa do touro infectado para a fêmea suscetível e vice-versa (Filha; Oliveira, 2009).

Nitroimidazóis também têm sido amplamente utilizados como promotores de crescimento em animais produtores de alimentos. Devido à sua eficácia no tratamento de animais destinados à produção de carne, ainda existe uso deliberado destes medicamentos veterinários, portanto, o uso ilegal de nitroimidazóis na criação de animais deve ser monitorado (Granja *et al.*, 2013).

Ronidazol (RNZ) cuja estrutura molecular é apresentada na Figura 2 é o nome comercial do antiparasitário 1-metil-2-(carbamoiloximetil)-5-nitroimidazol. Este se encontra inserido no grupo dos nitroimidazóis utilizados em práticas veterinárias dentre outras, no combate à *Tritrichomonas foetus*. É uma droga antibacteriana e antiprotozoária. A atividade deste nitroimidazol envolve a geração de nitroradicais livres via metabolismo dentro de protozoários e bactérias. Ronidazol interrompe a síntese do DNA em um organismo envolvendo reação com metabólitos intracelulares. Sua ação é específica para bactérias e protozoários anaeróbicos (Papich, 2016).

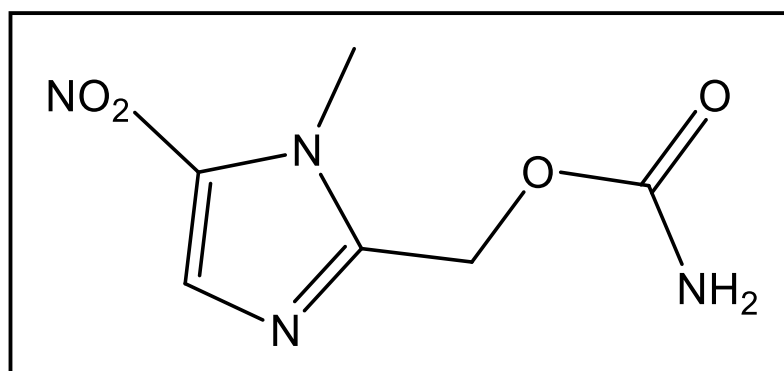


Figura 2. Estrutura química de ronidazol.

Segundo a legislação brasileira, o Limite Máximo de Resíduos de RNZ em carne bovina é $3,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ (MAPA, 2018)

Na literatura encontram-se diversos trabalhos envolvendo a análise de RNZ em diferentes matrizes, por exemplo, mel (Guo *et al.*, 2017; Sakamoto *et al.*, 2011), leite (Hernández-Mesa *et al.*, 2015), geléia real (Tao *et al.*, 2006), salmão (Sakamoto

et al., 2011), carnes de ave (Sun *et al.*, 2007; Wang, 2001-b), de suínos (Sun *et al.*, 2007), e de bovinos (Silva *et al.*, 2017). Em todos os trabalhos relatados foram utilizadas técnicas cromatográficas no desenvolvimento dos métodos.

Acaricidas utilizados em bovinos

Acaricidas são os agroquímicos que se destinam ao controle de ácaros. Os ácaros compreendem artrópodes incluídos na Ordem Acari da Classe Arachnida e distinguem-se facilmente dos insetos por apresentarem, de uma maneira geral, quatro patas nos estágios ninfais e adulto. Uma das características interessantes de acaricidas é a sua enorme variedade estrutural e especificidade: muitos acaricidas que são altamente ativos contra ácaros são relativamente inofensivos para insetos (Van Leeuwen *et al.*, 2013).

Pertencente à classe Arachnida (Campos *et al.*, 2012), *Rhipicephalus microplus* conhecido popularmente como carrapato do boi é um dos maiores ectoparasitas hematófagos que causa grande prejuízo aos rebanhos. Os prejuízos determinados pelo parasitismo por *Rhipicephalus microplus* à pecuária bovina brasileira são classificados em dois grupos principais. No primeiro grupo se enquadram os danos decorrentes da ação direta, caracterizados por espoliação sangüínea e suas conseqüências, como anemia, irritação, quedas no peso e na produção dos animais, predisposição à instalação de miíases e desvalorização dos couros. Em um segundo grupo está compreendido os transtornos ocasionados pela ação indireta, constituídos, essencialmente, pela transmissão de agentes causadores de doenças, como a “Tristeza Parasitária Bovina” e pelos gastos com a aquisição de medicamentos e de mão-de-obra especializada para o tratamento dos animais, além das perdas com os bovinos que vão a óbito, quando não adequadamente tratados (Furlong *et al.*, 2007).

No Brasil as perdas econômicas causadas por esse parasita chegam a dois bilhões de dólares ao ano (Grisi *et al.*, 2002). O prejuízo econômico ocasionado pela infestação de carrapatos ao rebanho se dá pelo custo no tratamento dos bovinos e sem dúvida pela perda da produção (Brito *et al.*, 2010). Devido a tais prejuízos na pecuária, é necessária atenção especial ao controle desse parasita no rebanho.

Na tentativa de evitar que a situação chegue a tal ponto, os acaricidas (ou carrapaticidas) são utilizados indiscriminadamente, levando ao aumento dos gastos e

à seleção e proliferação de populações de carrapatos resistentes às bases químicas disponíveis, além da poluição ambiental e da elevada quantidade de resíduos nos produtos derivados dos animais tratados. A presença de resíduos de carrapaticidas nos alimentos pode comprometer a segurança dos alimentos, principalmente se os níveis estiverem acima dos limites máximos permitidos pela legislação, podendo provocar sérios problemas comerciais e de saúde ambiental e pública.

Os mais recentes grupos químicos carrapaticidas disponíveis no mercado são os fenilpirazóis e as spinosinas (pertencente ao grupo das lactonas macrocíclicas). Porém ainda são de usos corrente carrapaticidas que têm como princípio ativo piretróides, organofosforados e amidinas, os quais permanecem no mercado devido ao baixo custo relativo destas bases e por ainda propiciarem o controle em algumas populações do carrapato do boi (Brito *et al.*, 2010). A resistência a diversos carrapaticidas que se desenvolveu em isolamento à *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887) se tornou um dos principais problemas da bovinocultura brasileira (Chagas *et al.*, 2002), pois com isso houve um aumento indiscriminado de seu uso em rebanhos infestados.

O aumento do uso de tais medicamentos provoca certo grau de poluição ambiental, além disso, resíduos de acaricidas no leite e/ou carne constituem um problema universal e de grande importância na saúde pública. Sua presença interfere na comercialização de produtos de origem animal (Chagas *et al.*, 2002).

Fipronil (FPN)

Um dos carrapaticidas muito utilizados no controle de *Rhipicephalus microplus* é Fipronil (FPN) 5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil]-4-[(trifluorometil)sulfinil]pirazol-3-carbonitrila), pertencente ao grupo químico dos pirazóis. A estrutura química de FPN é mostrada na Figura 3.

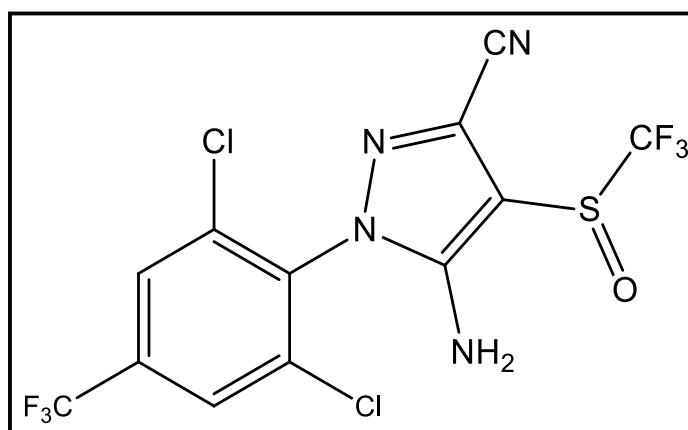


Figura 3. Estrutura molecular de fipronil.

Na Tabela 1 estão resumidas algumas propriedades físicas e químicas de FPN.

Tabela 1. Propriedades físicas e químicas de fipronil (FPN)

Propriedade		Referência
Massa molar (g mol ⁻¹)	437,15	(Tingle <i>et al.</i> , 2000)
Densidade a 20 °C (g mL ⁻¹)	1,6262	(Tingle <i>et al.</i> , 2000)
Temperatura de fusão (°C)	195,5 a 203	(Tingle <i>et al.</i> , 2000)
Solubilidade em água:		
pH 5 (g L ⁻¹)	0,0024	(Tingle <i>et al.</i> , 2000)
pH 9 (g L ⁻¹)	0,0022	
IDA ¹ (mg kg ⁻¹ p.c)	0,0002	(ANVISA, 2016)
Constante de dissociação (pK _a)	-	
LMR ² (µg L ⁻¹)	20,0	(MAPA, 2018)
Modo de aplicação	Pulverização, imersão ou pour on	(Furlong <i>et al.</i> , 2007)

IDA¹- Ingestão diária aceitável, LMR²- Limite máximo de resíduos

Além de atuar no controle de pragas veterinárias, FPN é um inseticida altamente ativo, eficaz, de amplo espectro e possui valor potencial para o controle de vasta gama de culturas (Tingle *et al.*, 2000). No Brasil FPN é utilizado no controle de formigas (Blitz[®]), pragas da raiz do milho e do gorgulho aquático do arroz (Klap[®]), insetos e pragas em culturas de cana-de-açúcar (Regent[®]), carrapatos e pulgas (Frontline[®]) (Amaral, 2012).

Diversos trabalhos encontrados na literatura relatam a análise de FPN em diferentes matrizes como solo (Brondi *et al.*, 2013; Caldas *et al.*, 2011; Cheng *et al.*,

2014; Cid *et al.*, 2012; Hadjmohammadi *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2015; Wang *et al.* 2014; Wu *et al.*, 2017), milho (Brondi *et al.*, 2013; Caldas *et al.*, 2011), leite e carne de búfala (Marchesan *et al.*, 2010), entre outras, sendo que em todas as análises citadas foram utilizadas técnicas cromatográficas para o desenvolvimento do método.

Produção de carne e leite bovinos

A cada ano, a participação brasileira no comércio internacional vem crescendo, com destaque para a produção de carne bovina, suína e de frango. Segundo o Ministério da Agricultura, até 2020, a expectativa é que a produção nacional de carnes suprirá 44,5% do mercado mundial (MAPA, 2017).

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) apontam que o Brasil possui o segundo maior número efetivo de bovinos (214,90 milhões de cabeças), é o segundo maior produtor e o primeiro exportador mundial de carne bovina (IBGE, 2018).

A produção leiteira do país também se destaca perante o mercado mundial, sendo o Brasil o sexto maior produtor mundial de leite e o terceiro país com maior número de vacas ordenhadas. Em 2017 a produção leiteira atingiu o valor de 33,49 bilhões de litros, sendo 11,96 bilhões de litros desses produzidos na região sul do país (IBGE, 2018).

Nos mapas apresentados na Figura 4 observa-se o número efetivo de bovinos, bovinos abatidos e os locais de maior produção de leite no Brasil.

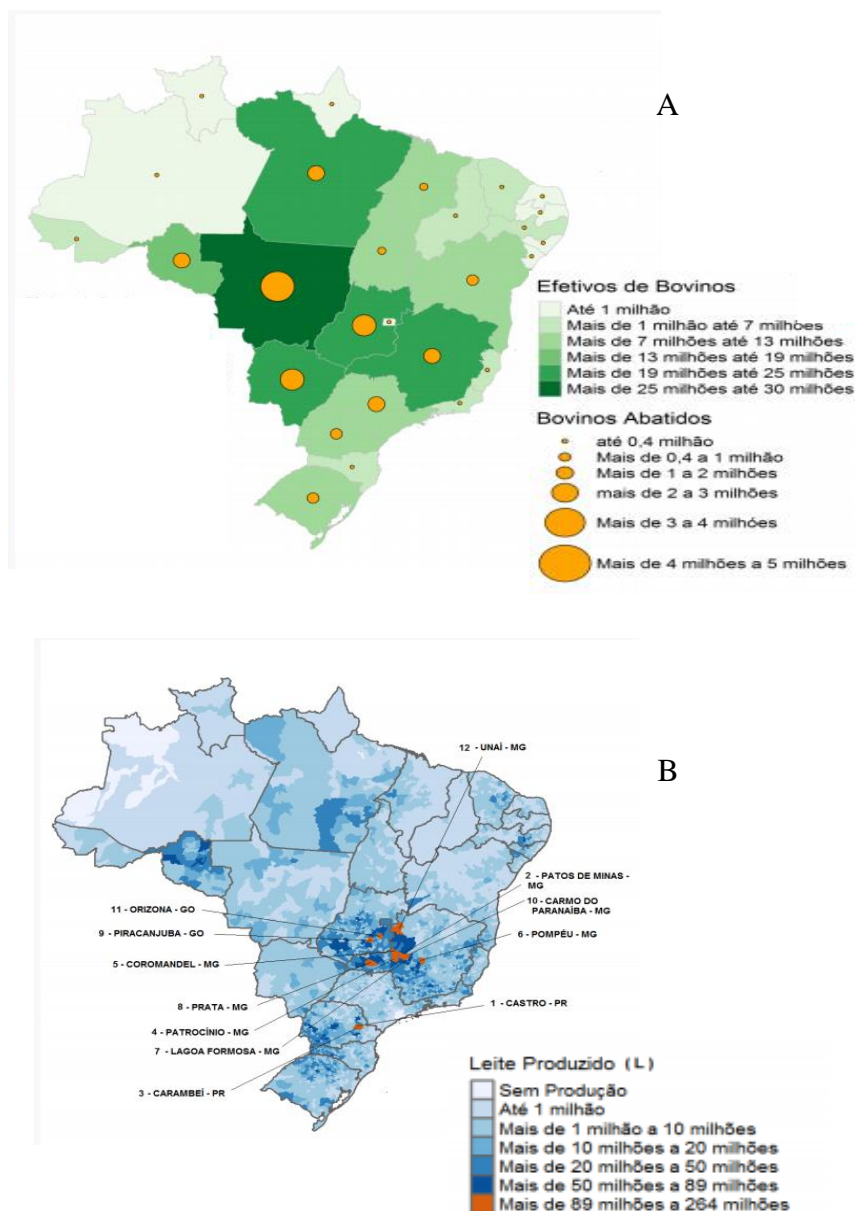


Figura 4. Mapas referentes (A) ao número efetivo de bovinos e bovinos abatidos e (B) ao leite produzido em litros no Brasil.

Fonte: Adaptado de IBGE (2018)

No Brasil, o órgão responsável por assegurar a qualidade de produtos de origem animal, comestíveis e não comestíveis, destinados ao mercado interno e externo, bem como de produtos importados é o Serviço de Inspeção Federal (SIF), vinculado ao Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA). Atualmente o país se destaca como um dos principais exportadores mundiais de

produtos de origem animal (MAPA, 2019).

Métodos eletroanalíticos

Os métodos eletroanalíticos englobam uma série de técnicas eletroanalíticas que possibilitam o estabelecimento de relações diretas entre propriedade elétrica mensuráveis do analito, como corrente, potencial, condutividade, resistência ou carga, com algum parâmetro químico intrínseco do analito (Brett & Brett, 1993; Pacheco *et al.*, 2013; Skoog *et al.*, 2006; Wang, 2001-b).

As técnicas eletroanalíticas apresentam algumas vantagens frente às técnicas tradicionais. A principal delas é a possibilidade, em diversos casos, de análise direta da amostra, sem necessidade de etapas de separação ou pré-tratamento da mesma. Ainda é possível analisar amostras coloridas ou com partículas sólidas dispersas no meio, o que as tornam muito úteis no monitoramento ambiental, no controle de qualidade de produtos, em processos industriais e em análises biomédicas (Galli *et al.*, 2006; Pacheco *et al.*, 2013). Mesmo em alguns casos, em que a utilização de técnicas eletroanalíticas para análise de amostras muito complexas requerer etapas de preparo da amostra, estas são mais simplificadas, de menor custo e necessitam de menor tempo (Codognoto *et al.*, 2004; Ripp *et al.*, 1992). Como vantagens também se podem mencionar: baixo custo operacional e instrumental; rapidez na obtenção de dados; sensibilidade; portabilidade; utilização de menor quantidade de solventes orgânicos, conseqüentemente, geração de menor volume de resíduos, além de possibilitarem maior padronização da metodologia (Arteaga *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2003; Galli *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2009).

Todas essas vantagens fazem com que as técnicas eletroanalíticas sejam uma alternativa viável para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários nas mais diversas matrizes.

Dentre as diversas técnicas classificadas como eletroanalíticas, destaca-se a grande aplicabilidade das técnicas voltamétricas. Estas baseiam-se na medida de intensidade da corrente elétrica, em uma célula eletroquímica, em função da aplicação de uma determinada diferença de potencial, induzindo a uma reação de oxirredução entre o analito e a superfície de um eletrodo de trabalho. A velocidade de oxidação ou redução do analito é limitada pela velocidade de transferência de

massa do analito, presente na solução que contém a amostra, até a superfície do eletrodo (Skoog *et al.*, 2006). O registro da corrente em função do potencial é denominado voltamograma e a magnitude da corrente obtida pela transferência de elétrons durante um processo de oxirredução pode estar relacionada com a quantidade de analito presente na superfície do eletrodo e conseqüentemente, na célula eletroquímica (Bard & Faulkner, 2001; Pacheco *et al.*, 2013).

A técnica precursora da voltametria foi a polarografia, desenvolvida pelo químico Jaroslav Heyrovsky em 1922 e que ainda é um ramo importante da voltametria, em que se utiliza a superfície de uma gota de mercúrio líquido como eletrodo de trabalho (Kounaves, 1997). Atualmente a célula eletroquímica convencionalmente utilizada é composta por três eletrodos imersos em uma solução contendo o analito e também um eletrólito de suporte que deve ser preferencialmente inerte, em concentração aproximadamente 100 vezes maior que a concentração do analito, facilitando a condutividade do sistema e garantindo uma força iônica constante, além de ser utilizado em muitos casos um tampão para manter o pH do meio (Pacheco *et al.*, 2013).

O sistema usual consiste em três eletrodos. Um deles é o eletrodo de trabalho, cujo potencial em relação a um eletrodo de referência varia linearmente com o tempo. As dimensões do eletrodo de trabalho são mantidas pequenas para aumentar sua tendência em se tornar polarizado. O eletrodo de referência tem um potencial que permanece constante durante o experimento. O terceiro eletrodo é um eletrodo auxiliar, ou contra-eletrodo, que frequentemente é um fio de platina. Tal eletrodo foi introduzido para assegurar uma situação potenciostática. Nessa configuração, os eletrodos são conectados a um amplificador operacional, que atuará quando for aplicada uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, fazendo com que a resistência do eletrodo de referência aumente e a do eletrodo auxiliar, diminua. Assim, a corrente passará entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar, evitando que ocorram distúrbios no eletrodo de referência (Pacheco *et al.*, 2013; Skoog *et al.*, 2006).

Os eletrodos de trabalho comuns podem ser sólidos metálicos como ouro e platina ou de outros materiais como carbono vítreo, pasta de carbono ou diamante dopado com boro, dentre outros. Ou ainda pode ser utilizada a gota de mercúrio em técnicas polarográficas. Todo o controle de potencial é realizado por um

potenciostato/galvanostato frente a um eletrodo de referência de potencial constante (Galli *et al.*, 2006).

As técnicas voltamétricas são classificadas em: voltametria cíclica (Cyclic Voltammetry - CV), voltametria linear (Linear Sweep Voltammetry - LSV), voltametria de onda quadrada (Square Wave Voltammetry - SWV) e voltametria de pulso diferencial (Differential Pulse Voltammetry - DPV). Estas se diferem, basicamente, pela forma como o potencial é aplicado ao eletrodo de trabalho e pela forma como o sinal analítico (corrente) é obtido, o que gera diferentes características às técnicas, tais como, limite de detecção e velocidade da análise (Pacheco *et al.*, 2013).

Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica eletroanalítica importante e amplamente empregada. Embora a VC não seja utilizada com frequência na análise quantitativa, ela encontra ampla aplicabilidade no estudo de reações redox, na detecção de intermediários de reação e na observação e acompanhamento de reações envolvendo produtos formados nos eletrodos. Na VC, em primeiro lugar a varredura de potencial é feita em uma direção e, em seguida, na outra, enquanto a corrente é medida. Um experimento envolvendo VC pode empregar um ciclo inteiro, um ciclo parcial ou ainda vários ciclos (Skoog *et al.*, 2006).

A voltametria cíclica é a técnica voltamétrica mais utilizada para se obter informações qualitativas, sendo geralmente a primeira análise realizada em um estudo eletroquímico. Com estas análises, obtêm-se a corrente de pico anódico (I_{pa}), corrente de pico catódico (I_{pc}), potencial de pico anódico (E_{pa}) (relativo ao processo de oxidação) e potencial de pico catódico (E_{pc}) (relativo ao processo de redução) (Bard & Faulkner, 2001; Skoog *et al.*, 2006).

A VC também é largamente utilizada como critério de diagnóstico dos processos redox que acontecem na interface entre o eletrodo de trabalho e a solução de análise. Utilizando-se como variáveis a intensidade de corrente de pico (I_p), a velocidade de varredura de potencial (v) e os potenciais de pico (E_p), é possível identificar processos de oxidação, redução e de adsorção/dessorção, o número de etapas envolvidas no processo eletródico ou a reversibilidade do mesmo (Souza *et al.*, 2003).

A VC baseia-se na aplicação de uma varredura linear de potencial, de forma triangular, ao eletrodo de trabalho, ou seja, é realizada uma varredura no sentido pré-selecionado (catódico ou anódico) e posteriormente no sentido inverso, a uma velocidade preestabelecida. O potencial aplicado (E) atua como força motriz para gerar uma corrente (i) faradáica pela oxidação e/ou redução do analito, a qual é mensurada e plotada *versus* o potencial, fornecendo um voltamograma cíclico (Bard & Faulkner, 2001; Skoog *et al.*, 2006; Wang 2001-b).

A Figura 5 exhibe a forma de aplicação do potencial (Figura 5A) e o sinal voltamétrico obtido (Figura 5B-D).

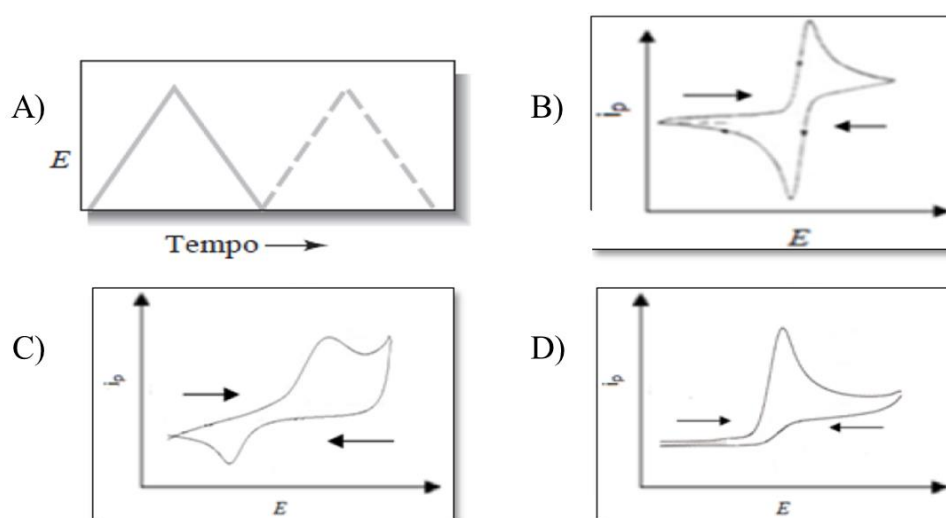


Figura 5. (A) Forma de aplicação do potencial de varredura em VC; (B) sinal voltamétrico registrado para um sistema tipicamente reversível em VC; (C) sinal voltamétrico registrado para um sistema quase reversível em VC; (D) sinal voltamétrico registrado para um sistema irreversível em VC.

Voltametria de pulso diferencial

A fim de minimizar a contribuição da corrente capacitiva nas medidas voltamétricas utilizam-se as técnicas de pulso. As técnicas de pulso e suas variantes são baseadas na aplicação de degraus de potencial, fixos ou variáveis.

Na voltametria de pulso diferencial (DPV), pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente são aplicados ao eletrodo de trabalho. A corrente é medida duas vezes, uma antes da aplicação do pulso (S_1 –

Figura 6A) e outra ao final do pulso (S_1 – Figura 6A), conforme ilustrado na Figura 6.

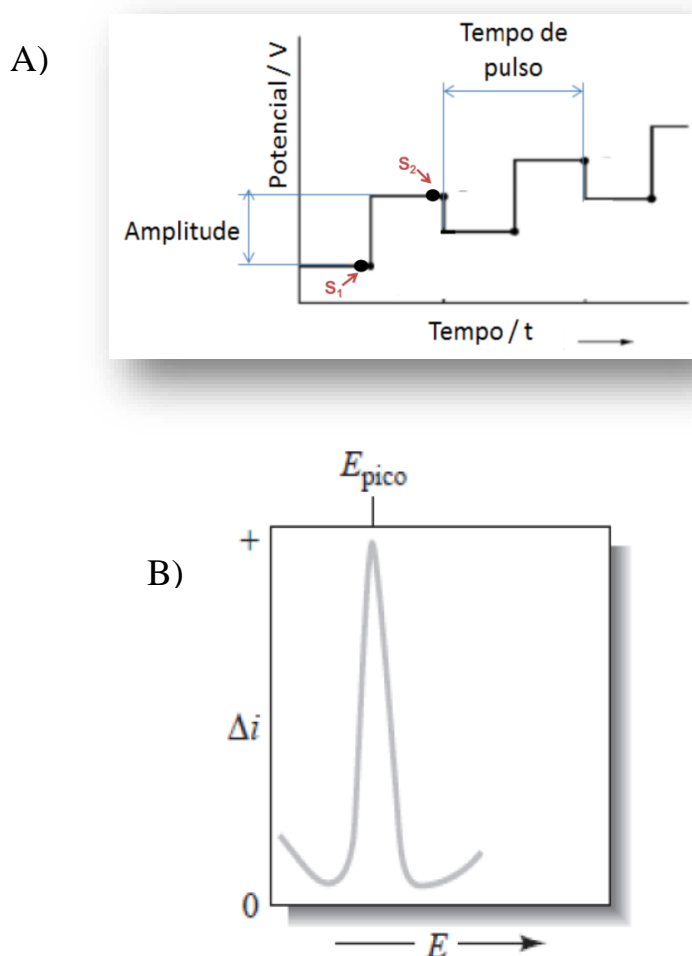


Figura 6. (A) forma de aplicação do pulso de potencial em DPV; (B) sinal voltamétrico registrado para DPV.

A primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda, e a diferença das correntes é plotada versus o potencial aplicado. Após a aplicação dos pulsos de potencial a corrente capacitiva se extingue mais rapidamente que a componente faradáica, sendo o sinal analítico mensurado ao final da aplicação. Tal perturbação adicional, o pulso de potencial, assim como uma alteração sensível de temperatura e/ou pressão em sistemas homogêneos, representa uma alteração instantânea no sistema eletroquímico. O voltamograma resultante consiste de picos de corrente de forma gaussiana, cuja área deste pico ou a altura é diretamente proporcional à concentração do analito (Pacheco *et al.*, 2013; Skoog *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2003; Wang, 2001-b).

Voltametria de onda quadrada

Na voltametria de onda quadrada o pulso de potencial é aplicado ao eletrodo de trabalho como onda quadrada simétrica, sobreposta a uma rampa de potencial na forma de escada (Souza *et al.*, 2003; Wang, 2001-b), como o representado na Figura 7.

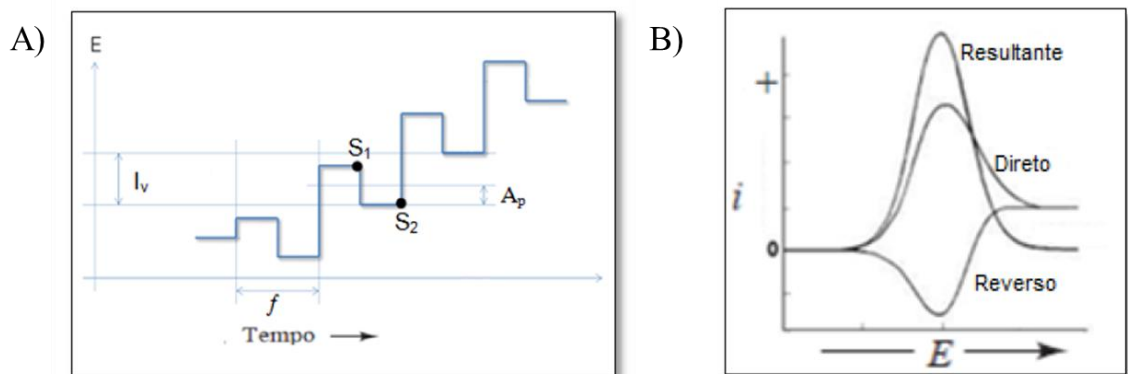


Figura 7. (A) forma de aplicação do pulso de potencial em SWV; (B) sinal voltamétrico registrado para SWV.

A corrente é amostrada duas vezes, uma ao final do pulso direto (S_1 – Figura 7A) e outra ao final do pulso reverso (S_2 – Figura 7A), sendo o voltamograma obtido o resultado da diferença entre essas duas correntes amostradas *versus* a rampa de potencial aplicado. A contribuição da corrente reversa pode variar, sendo menor quanto menor for à reversibilidade do sistema redox (Skoog *et al.*, 2006).

Eletrodos de trabalho

Uma vez que as reações de oxirredução monitoradas ocorrem entre o analito e a superfície do eletrodo de trabalho, as informações obtidas pelas técnicas voltamétricas são altamente dependentes da superfície eletródica utilizada. Na escolha do eletrodo de trabalho para o desenvolvimento de métodos deve ser considerado principalmente o comportamento redox do analito de interesse na superfície do eletrodo, ou seja, o analito deve interagir com a superfície eletródica resultando na transferência de elétrons.

O eletrodo de trabalho deve apresentar outras características importantes como: elevada razão sinal-ruído, boa reprodutibilidade da superfície, adequação à janela de potencial de trabalho e condutividade elétrica (Bard & Faulkner, 2001;

Wang 2001-b). Além disso, fatores como, propriedades mecânicas e o custo de fabricação devem ser considerados para a escolha adequada de um eletrodo de trabalho (Pacheco, 2010). Alguns materiais frequentemente utilizados para construção de eletrodos sólidos são platina, ouro, carbono, irídio, ródio, paládio, níquel, ferro, cobre e tungstênio (Galli *et al.*, 2006).

Eletrodo de carbono vítreo

Em 1962 foram realizados os primeiros estudos para confecção de carbono vítreo como material utilizado em eletrodos a partir de uma resina fenólica. Os materiais de carbono vítreo são geralmente formados por um programa de aquecimento cuidadosamente controlado em atmosfera inerte (Van der Linden, Dieker, 1980). Esse material possui baixa densidade, baixa expansão térmica, alta resistência à corrosão e alta condutividade térmica e elétrica (Friedrich *et al.*, 2004).

Quando comparados a outros alótropos do carbono, a estrutura do carbono vítreo apresenta propriedades físicas interessantes. Isso se deve primeiramente ao seu método de formação permitir que os materiais produzidos tenham diversas formas possíveis. Esta propriedade, juntamente com o tamanho extremamente pequeno dos poros do carbono vítreo faz com que ele seja um material bastante atrativo para preparação de eletrodos inertes, podendo ser utilizado inclusive em meios altamente corrosivos (Van der Linden, Dieker, 1980). Na Figura 8 está representada sua estrutura final obtida após tratamento térmico (Figura 8A), juntamente com a microscopia eletrônica de alta resolução da superfície do carbono vítreo (Figura 8B) (Jenkins, Kawamura, 1971; Van der Linden, Dieker, 1980).

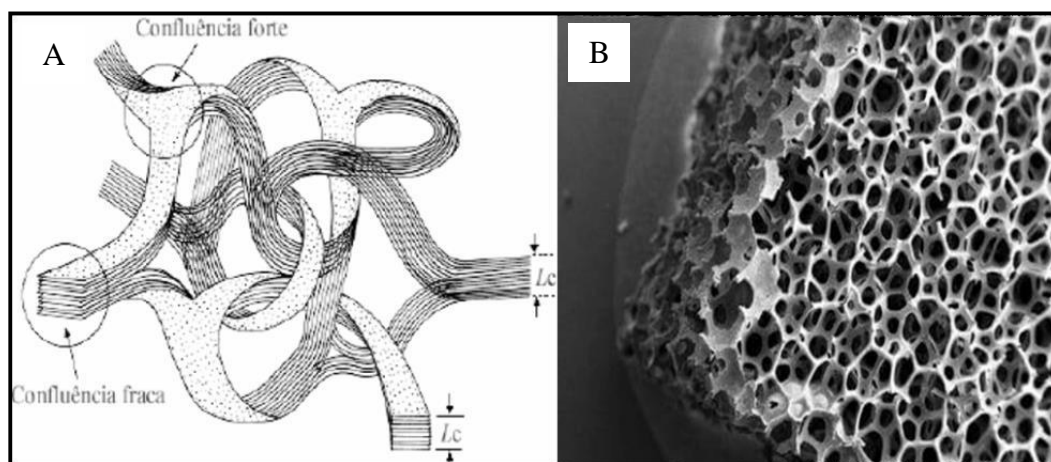


Figura 8. (A) Modelo estrutural e (B) microscopia eletrônica de alta eficiência para o carbono vítreo.

Fonte: Adaptado de (A) Jenkins, Kawamura (1971) e (B) Van der Linden, Dieker (1980).

Eletrodo de pasta de carbono

Este eletrodo é constituído de duas fases, uma delas é de carbono (eletroquimicamente ativa) e outra inerte (aglutinante e não condutora). Em 1958, na tentativa de preparar um eletrodo gotejante para ser utilizado em regiões de potenciais anódicos em que o eletrodo de gota pendente de mercúrio (HDME) apresenta sérias limitações devido à oxidação do mercúrio metálico, foi desenvolvido o primeiro eletrodo de pasta de carbono (CPE). O eletrodo não apresentou resultados satisfatórios, devido à alta resistência elétrica causada pelo aglutinante utilizado na preparação, porém a construção do CPE foi de extrema importância no desenvolvimento de novos procedimentos eletroanalíticos (Adams, 1958).

Uma das maiores vantagens do eletrodo de pasta de carbono sobre todos os outros eletrodos sólidos é a possibilidade de preparar, de maneira simples, uma nova superfície, a cada medida realizada. Diversas análises apresentam adsorção de produtos na superfície do eletrodo, assim essa renovação é extremamente importante nestes casos para se evitar uma passivação da superfície do eletrodo. Outra propriedade importante é a baixa corrente residual, que é menor do que em eletrodos feitos de grafite pirolítico (PGE) e carbono vítreo (GCE) (Lindquist, 1974).

O preparo da pasta de carbono consiste na mistura de dois componentes: o pó de grafite que deve ter alta pureza química, baixa capacidade de adsorção de

oxigênio e impurezas eletroativas contidas na solução, além de apresentar uma distribuição granulométrica uniforme e o aglutinante, responsável pela consistência da pasta, deve preencher os espaços entre as partículas de grafite, ser eletroinativo, quimicamente inerte, imiscível com a água (ou outros solventes), possuir baixa volatilidade e não conter impurezas (Ulakhovich *et al.*, 1993).

Método voltamétrico de triagem

As técnicas voltamétricas permitem análises de triagem por apresentarem algumas vantagens incluindo rapidez na obtenção de respostas, alta sensibilidade, facilidade de operação, medição in loco, baixo custo instrumental e por serem técnicas que, na maioria das vezes, não necessitam de pré-tratamento das amostras (Nunes *et al.*, 2016).

Devido a inúmeras vantagens, nota-se uma tendência na utilização dessas técnicas ao serem desenvolvidos métodos rápidos de triagem em diferentes matrizes, como por exemplo, cocaína (Freitas *et al.*, 2017), chás (Domínguez, Doménech-carbó, 2015), águas naturais (Nunes *et al.*, 2016) e peixes (Ni *et al.*, 2011-a). Em uma busca rápida na base de dados *Science Direct* (2019) é possível observar essa tendência crescente nos últimos anos, como mostra o gráfico da Figura 9.

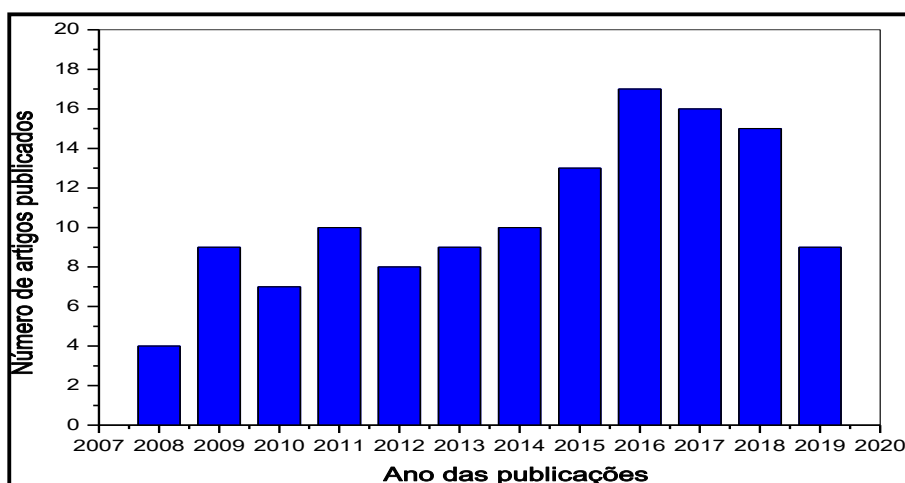


Figura 9. Relatório de artigos publicados referentes aos termos de busca “screening method and voltammetry”, no período de 2008 a julho de 2019.

Base de dados: Science Direct, 2019.

As medidas voltamétricas são vantajosas em estudos de monitoramento (triagem) e métodos convencionais como a cromatografia, por exemplo, podem ser usados para confirmar a presença do analito, que já exibiu resposta voltamétrica positiva (Nunes *et al.*, 2016).

Assim, são necessárias tecnologias de triagem rápida, mais simples e econômicas, para uso global, a fim de selecionar as amostras questionáveis, que poderiam então ser enviadas para posterior análise confirmatória (Ni *et al.*, 2011-b).

Referências Bibliográficas

ADAMS, R. N. Carbon Paste Electrodes - Analytical Chemistry. **Analytical Chemistry**, v. 30, p. 1576–1576, 1958.

AERTS, M. M. L.; HOGENBOOM, A. C.; BRINKMAN, U. A. T. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 667, n. 1, p. 1–40, 1995.

AMARAL, R. B. Investigação do comportamento eletroquímico do inseticida fipronil e desenvolvimento de metodologia eletroanalítica. Tese (Doutorado em Ciências), 123p. Universidade de São Paulo, 2012.

ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Índice monográfico**. Brasília, 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/f43.pdf/cee42727-46ab44a2-b88e-10ea4e8faab9>>. Acesso em 24 de fevereiro de 2019.

ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Programa Nacional De Análise De Resíduos De Medicamentos Veterinários Em Alimentos Expostos Ao Consumo – **Pamvet**. Brasília, 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 07 de agosto de 2018.

ARTEAGA, J. F. et al. Comparison of the simple cyclic voltammetry (CV) and DPPH assays for the determination of antioxidant capacity of active principles. **Molecules**, v. 17, n. 5, p. 5126–5138, 2012.

BARBOSA, C. C. **Perfil de Inovação Farmacêutica Veterinária no Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ciências), 64p. Universidade de São Paulo, 2017.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.

BISWAS, A. K.; KONDAIAH, N.; ANJANEYULU, A. S. R.; MANDAL, P. K. Food Safety Concerns of Pesticides, Veterinary Drug Residues and Mycotoxins in Meat and Meat Products. **Asian Journal of Animal Sciences**, v. 4, n. 2, p. 46-55, 2010.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry** - Principles, Methods, and Applications. Nova York: Oxford University Press, 1993.

BRITO, L. G.; ROCHA, R. B.; NETTO, F. G. S.; BARBIERI, F. S.; OLIVEIRA, M. C. S.; GONÇALVES, M. A. R.; CARVALHO, G. L. O. Eficácia de carrapaticidas em rebanhos leiteiros de Rondônia. *Circular técnica*. **EMBRAPA**, ISSN 0103-9334, 2010.

BRONDI, S. H. G.; SOUZA, G. B.; NOGUEIRA, A. R. A.; CAMARGO, L. A.; MAJARON, R. F. Desenvolvimento e validação do método QuEChERS na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em leite e carne de búfalo. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 153–158, 2013.

CALDAS, S. S.; BOLZAN, C. M.; CERQUEIRA, M. B.; TOMASINI, D.; FURLONG, E. B.; FAGUNDES, C.; PRIMEL, E. G. Evaluation of a Modified QuEChERS Extraction of Multiple Classes of Pesticides from a Rice Paddy Soil by LC-APCI-MS / MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 11918–11926, 2011.

CAMPOS, R.N.S.; BACCI, L.; ARAÚJO, A.P.A.; BLANK, A.F.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; SANTOS, G.R.A. E RONER, M. N. . Óleos essenciais de plantas medicinais e arométicas no controle do carrapato *Rhipicephallus microplus*. **Archivos de Zootecnia**, v. 61, p. 67–78, 2012.

CHAGAS, A. C. S.; PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; FURLONG, J. Ação larvicida de derivados arilsulfonílicos da (+)- cânfora e da (+)- isopinocanfona sobre o carrapato *Boophilus microplus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 5, p. 462–467, 2002.

CHENG, Y.; DONG, F.; LIU, X.; XU, J.; MENG, W.; LIU, N.; CHEN, Z.; TAO, Y.; ZHENG, Y. Simultaneous determination of fipronil and its major metabolites in corn and soil by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 6, p. 1788–1795, 2014.

CID, Y. P.; FERREIRA, T. P.; MEDEIROS, D. M. V.; OLIVEIRA, R. M.; SILVA, N. C. C.; MAGALHÃES, V. S.; SCOTT, F.B. Determination of fipronil in bovine plasma by solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet detection. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2063–2066, 2012.

CODOGNATO, L.; ZUIN, V. G.; SOUZA, D.; YARIWAKE, J. H.; MACHADO, S. A.; AVACA, L. A. Electroanalytical and chromatographic determination of pentachlorophenol and related molecules in a contaminated soil: a real case example. **Microchemical Journal**, v. 77, p. 177–184, 2004.

DELGADO, F. E. F.; LIMA, W. S.; CUNHA, A. P.; BELLO, A. C. P. P.; DOMINGUES, L. N.; WANDERLEY, R. P. B.; LEITE, P. V. B.; LEITE, R. C. Verminoses dos bovinos: Percepção de pecuaristas em Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 29–33, 2009.

DOMÍNGUEZ, I.; DOMÉNECH-CARBÓ, A. Screening and authentication of tea varieties based on microextraction-assisted voltammetry of microparticles. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 210, p. 491–499, 2015.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/home.html>>. Acesso em 24 de fevereiro de 2019.

FILHA, E. S.; OLIVEIRA, S. M. Divulgação técnica. Tricomonose Bovina. **Biológico**, v. 71, p. 9–11, 2009.

FREITAS, J. M.; RAMOS, D. L. O.; SOUSA, R. M. F.; PAIXÃO, T. R. L. C.; SANTANA, M. H. P.; MUNÕZ, R. A. A.; RITCHER, E. M. A portable electrochemical method for cocaine quantification and rapid screening of common adulterants in seized samples. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 243, p. 557–565, 2017.

FRIEDRICH, J. M.; PONDE-DE-LEÓN, C.; READE, G. W.; WALSH, F. C. Reticulated vitreous carbon as an electrode material. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 561, n. 3, p. 203–217, 2004.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R.; PRATA, M. C. A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, ano 27, nº 159, p. 1–7, 2007.

GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105–112,

2006.

GJEDREM, T.; ROBINSON, N.; RYE, M. The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: A review. **Aquaculture**, v. 350–353, p. 117–129, 2012.

GOOKIN, J. L.; COPPLE, C. N.; PAPICH, M. G.; POORE, M. F.; STAUFFER, S. H.; BIRKENHEUER, A. J.; TWEDT, D. C.; LEVY, M. G. Efficacy of ronidazole for treatment of feline *Tritrichomonas foetus* infection. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 3, p. 536–543, 2006.

GRANJA, R. H. M. M.; NINO, A. M. M.; RECHE, K. V. G.; GIANNOTTI, F. M.; DE LIMA, A. C.; WANSCHER, A. C. B. A.; SALERNO, A. G. Determination and confirmation of metronidazole, dimetridazole, ronidazole and their metabolites in bovine muscle by LC-MS/MS. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 30, n. 6, p. 970–976, 2013.

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA-BORJA E G.E; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 125, p. 8–10, 2002.

GUO, X-C.; XIA, Z.-Y.; WANG, H.-H.; KANG, W.-Y.; LIN, L-M.; CAO, W-Q.; ZHANG, H-W.; ZHOU, W-H. Molecularly imprinted solid phase extraction method for simultaneous determination of seven nitroimidazoles from honey by HPLC-MS/MS. **Talanta**, v. 166, p. 101–108, 2017.

HADJMOHAMMADI, M. R.; NIKOU, S. M.; KAMEL, K. Determination of fipronil residue in soil and water in the rice fields in north of Iran by RP-HPLC method. **Acta Chimica Slovenica**, v. 53, n. 4, p. 517–520, 2006.

HERNÁNDEZ-MESA, M.; LARA, F. J.; CRUCES-BLANCO, C.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.. Determination of 5-nitroimidazole residues in milk by capillary electrochromatography with packed C₁₈ silica beds. **Talanta**, v. 144, p. 542–550, 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa da Pecuária Municipal. Diretoria de Pesquisas (DPE)** 2018. Disponível em: <

https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/media/com_mediaibge/arquivos/6d3123bbf5f78aa3492c41003c7a38f6.pdf>. Acesso em 24 de fevereiro de 2019.

JENKINS, G. M.; KAWAMURA, K. Structure of Glassy Carbon. **Nature**, v. 231, p. 175–176, 1971.

KOUNAVES, S. P. Voltammetric Techniques. In: Settle, F. A. (Ed.). **Handbook Of Instrumental Techniques For Analytical Chemistry**. Englewood Cliffs: Prentice Hall. p. 719-720, 1997.

LI, M.; LI, P.; WANG, L.; FENG, M.; HAN, L. Determination and Dissipation of Fipronil and Its Metabolites in Peanut and Soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.63, p. 4435-4443, 2015.

LINDQUIST, J. A study of seven different carbon paste electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 37–46, 1974.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Exportação**. Brasília 2017. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/exportacao>>. Acesso em 25 de fevereiro de 2019.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 20**, de 26 de Julho de 2018. Brasília 2018. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>>. Acesso em 24 de fevereiro de 2019.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 42**, de 20 de Dezembro De 1999. Diário Oficial Da União Da República Federativa Do Brasil, Brasília, 1999.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lei Nº 12.689, De 19 de Julho de 2012**. Brasília, 2012. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2012/Lei/L12689.htm>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2019.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 88, DE 06 de novembro de 2015**. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/aceso-a-informacao/participacao-10 social/consultas-publicas/documentos/portaria-88-2015-](http://www.agricultura.gov.br/aceso-a-informacao/participacao-10-social/consultas-publicas/documentos/portaria-88-2015-)

projeto-instrucao-normativa-antiparasitarios.docx/view>. Acesso em 13 de agosto de 2018.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Produtos veterinários**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios>>. Acesso em 24 de fevereiro de 2019.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio**. Brasília, 2018. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio>>. Acesso em 24 de fevereiro de 2019.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Serviço de Inspeção Federal (SIF)**. Brasília, 2019. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/sif/servico-de-inspecao-federal-sif>>. Acesso em 25 de fevereiro de 2019.

MARCHESAN, E.; SARTORI, G. M. S.; AVILA, L. A.; MACHADO, S. L. A.; ZANELLA, R.; PRIMEL, E. G.; MACEDO, V. R. M.; MARCHEZAN, M. G. Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1053–1059, 2010.

NI, Y.; LI, S.; KOKOT, S. Simultaneous voltammetric analysis of tetracycline antibiotics in foods. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 1157–1163, 2011-a.

NI, Y.; WANG, L.; KOKOT, S. Simultaneous determination of three herbicides by differential pulse voltammetry and chemometrics. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 46, n. 4, p. 328–335, 2011-b.

NUNES, C. N.; PAULUK, L. E.; FELSNER, M. L.; ANJOS, V. E.; QUINÁLIA, S. P. Rapid Screening Method for Detecting Ethinyl Estradiol in Natural Water Employing Voltammetry. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2016, 2016.

ONU. United Nations. **World Population Prospects The 2017 Revision**. The United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division,

New York, 2017.

PACHECO, L. C. M. **Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para a determinação de resíduos de pesticidas em amostras de alimentos e de águas naturais.** Tese (Doutorado em Química), 172p. Universidade Federal do Ceará, 2010.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltamétricas: Uma Breve Revisão Sobre Os Conceitos. **Revista Virtual De Química.** v. 5, p. 516-537, 2013.

PAPICH, M. G. **Saunders Handbook of Veterinary Drugs Small and Large Animal.** 4. ed., v. 1. St Louis: ELSEVIER, 2016. 928p.

REIS, N. S.; SERRANO, S. H P.; MENEGHATTI, R.; GIL, E. S. Métodos eletroquímicos usados para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. **Latin American Journal of Pharmacy,** v. 28, n. 6, p. 949–953, 2009.

RIPP, E. B.; ZUMAN, P.; SESTHKOVL, I.; HORLJK, V. Polarographic determination of some pesticides. Application to a study of their adsorption on lignin. **Journal of agricultural and food chemistry,** v. 40, p. 2016–2021, 1992.

SAKAMOTO, M.; TAKEBA, K.; SASAMOTO, T.; KUSANO, T.; HAYASHI, H.; KANAI, S.; KANDA, M.; NAGAYAMA, T. Determination of dimetridazole, metronidazole and ronidazole in salmon and honey by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan,** v. 52, n. 1, p. 51–8, 2011.

SANTOS, S. A.; CARDOSO, E. L.; SILVA, R. A. M. S. S.; PELLEGRIN, A. O. Princípios Básicos para a Produção Sustentável de Bovinos de Corte no Pantanal. *Documentos.* **EMBRAPA,** ISSN 11517-1973, 2002.

SILVA, G. R. DA; LIMA, J. A.; SOUZA, L. F. DE; SANTOS, F. A.; LANA, M. A. G.; ASSIS, D. C. S. DE; CANÇADO, S. DE V. Multiresidue method for identification and quantification of avermectins, benzimidazoles and nitroimidazoles residues in bovine muscle tissue by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) using a QuEChERS approach. **Talanta,** v. 171, p. 307–320, 2017.

SINDAN. **Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal**. disponível em: < <http://www.sindan.org.br/mercado-brasil-2017/>>. Acesso em 25 de fevereiro de 2019.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8 ed. São Paulo: Thomson, 2006.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003.

SUN, H. W.; WANG, F. C.; AI, L. F. Simultaneous determination of seven nitroimidazole residues in meat by using HPLC-UV detection with solid-phase extraction. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 857, n. 2, p. 296–300, 2007.

TAO, D.; JINZHONG, X. U.; CHONGYU, S.; YUAN, J.; HUILAN, C.; BIN, W. U.; ZENGYUN, Z.; GONGHAI, L. I.; JING, Z.; FEI, L. I. U. Determination of Three Nitroimidazole Residues in Royal Jelly by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Chinese Journal of Chromatography**, v. 24, n. 4, p. 331–334, 2006.

TINGLE, C. C. D.; ROTHER, J. A.; DEWHURST, C. F.; LAUER, S.; KING, W. J. Health and environmental effects of fipronil. **Pesticide Action Network UK**, 2000.

ULAKHOVICH, N. A.; MEDYANTSEVA, E. P.; BUDNIKOV, G. K. Carbon-Paste Electrode As A Sensor In Voltammetric Analysis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 48, p. 682–688, 1993.

VAN DER LINDEN, W. E.; DIEKER, J. W. Glassy carbon as electrode material in electro- analytical chemistry. **Analytica Chimica Acta**, v. 119, n. 1, p. 1–24, 1980.

VAN LEEUWEN, T.; WANNES, D.; MIODRAG, G.; LUC, T.; RENÉ, F. Spider mite control and resistance management: Does a genome help? **Pest Management Science**, v. 69, n. 2, p. 156–159, 2013.

WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. 2 ed. New York: John Wiley e Sons, 2001-a.

WANG, J. H. Determination of three nitroimidazole residues in poultry meat by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. **Journal of Chromatography**

A, v. 918, n. 2, p. 435–438, 2001-b.

WANG, T.; HU, J.; LIU, C. Simultaneous determination of insecticide fipronil and its metabolites in maize and soil by gas chromatography with electron capture detection. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, n. 5, p. 2767–2774, 2014.

WU, X.; YU, Y.; XU, J.; DONG, F.; LIU, X.; DU, P.; LIU, X.; DU, P. Residue analysis and persistence evaluation of fipronil and its metabolites in cotton using high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–12, 2017.

CAPÍTULO 2

Método voltamétrico de triagem para determinação de Ronidazol em carne bovina

Resumo

Um método voltamétrico inédito de triagem foi desenvolvido para determinar resíduos do antiparasitário ronidazol (RNZ) em amostras de carne bovina utilizando eletrodo de carbono vítreo (GCE) e voltametria de pulso diferencial (DPV). A voltametria cíclica (VC) indicou que um processo catódico irreversível ocorre em aproximadamente $-0,740\text{ V}$ (vs. $\text{Ag}|\text{AgCl}, \text{KCl}_{\text{sat.}} 3,0\text{ mol L}^{-1}$) em tampão fosfato ($0,100\text{ mol L}^{-1}$) pH 6,5 como eletrólito de suporte. Para a quantificação de resíduos de RNZ em carne bovina e validação do método utilizou-se a técnica de DPV. O novo método apresentou linearidade e precisão adequadas e coeficiente de determinação $>0,99$. Foram obtidos limites de detecção (LD) $0,062\text{ mg kg}^{-1}$ e $0,107\text{ mg kg}^{-1}$ e quantificação (LQ) de $0,207\text{ mg kg}^{-1}$ e $0,358\text{ mg kg}^{-1}$ respectivamente. A porcentagem de recuperação para três diferentes concentrações de RNZ em amostras de carne bovina variou entre 99,3% e 100,3% e a metodologia desenvolvida apresentou valores máximos de CV de 4,03% e 6,78% para repetitividade e precisão intermediária, respectivamente. O método se mostrou eficiente para a triagem de RNZ em carne bovina.

Palavras-chave: Agente antiparasitário, carne bovina, técnicas eletroanalíticas, eletrodo de carbono vítreo.

Introdução

A cada ano, a participação brasileira no comércio internacional vem crescendo, com destaque para a produção de carne bovina, suína e de frango. O Ministério da Agricultura estima que até 2020 a produção nacional de carnes suprirá 44,5% do mercado mundial indicando que o Brasil pode manter posição de primeiro exportador mundial de carne bovina (MAPA, 2017).

O crescimento da cadeia produtiva da carne bovina está diretamente relacionado às tendências do mercado, em que o aumento da produtividade está atrelado à segurança dos alimentos e à sua qualidade (Araújo *et al.*, 2017). À vista disso, tal crescimento se apresenta como um grande desafio, pois este está intimamente relacionado ao uso contínuo de diferentes medicamentos veterinários voltados para a prevenção, tratamento e cura de diversas doenças do rebanho.

Os compostos nitroimidazólicos apresentam uma gama de atividades biológicas, sendo principalmente utilizados como radiosensibilizadores, antibacterianos e drogas antiprotozoárias. De acordo com a posição do substituinte nitro no anel imidazólico, é possível classificar os derivados nitroimidazólicos como derivados 2-, 4- e 5-nitroimidazólicos (Church *et al.*, 1990). Ronidazol (RNZ), cuja estrutura molecular é apresentada na Figura 1, é o nome comercial do antiparasitário 1-metil-2-(carbamoiloximetil)-5-nitroimidazol. Esse medicamento é utilizado no tratamento da tricomonose genital bovina, uma doença sexualmente transmissível causada pelo protozoário flagelado *tritrichomonas fetus*. Esta doença pode infectar o trato urogenital bovino, causando morte embrionária, repetição deaios e aborto, e aumentar o número de vacas vazias até o final da estação reprodutiva, além de outros problemas que promovem consideráveis danos econômicos (Alves *et al.*, 2011; Duarte *et al.*, 2009; Zimmer *et al.*, 2013).

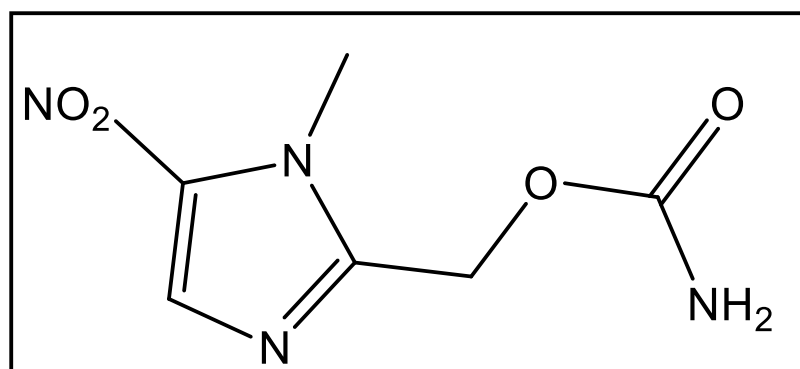


Figura 1. Fórmula estrutural do antiparasitário ronidazol (RNZ)

Técnicas analíticas têm sido desenvolvidas para determinar resíduos de contaminantes de RNZ em diferentes matrizes, de modo que todos os requisitos legais sejam cumpridos em produtos como ovos, carne de aves, músculo suíno, fígado de suíno, carne bovina e leite, entre outros (Granja et al., 2013; Kumar et al., 2014; Mottier et al., 2006; Sams et al., 1998; Xia et al., 2007). De acordo com o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal – PNCRC de 2018, publicado por meio da instrução normativa nº 20, de 26 de julho de 2018, o limite máximo de referência de ronidazol em carne bovina é 3,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A Tabela 1 apresenta alguns métodos analíticos para determinar RNZ já relatados na literatura.

Tabela 1. Métodos analíticos empregados para análise de ronidazol (RNZ)

Matriz	Extração	Método	Recuperação (%)	LD/LQ	Referência
Carne bovina	Acetonitrila/ ácido acético	¹ UHPLC- MS/MS	95,4-101,4	0,055 µg kg ⁻¹ / 0,093 µg kg ⁻¹	(Silva <i>et al.</i> , 2017)
Mel	Acetato de zinco/ acetato de etila	² HPLC- MS/MS	86,7-90,3	0,5 µg kg ⁻¹ / 1,0 µg kg ⁻¹	(Guo <i>et al.</i> , 2017)
Mel	Acetato de etila	³ LC- MS/MS	96-101	0,2 µg kg ⁻¹ / NR	(Sakamoto <i>et al.</i> , 2011)
Leite	Acetonitrila	Eletrocromatografia capilar	81-107	6,0 µg L ⁻¹ / 19,0 µg L ⁻¹	(Hernández-Mesa <i>et al.</i> , 2015)
Leite	Ácido tricloroacético	Eletroforese capilar	60	1,71 µg L ⁻¹ / 5,7 µg L ⁻¹	(Hernández-Mesa <i>et al.</i> , 2014)
Geléia real	Acetato de etila	HPLC- MS/MS	96,6-107	0,5 µg kg ⁻¹ / 1,0 µg kg ⁻¹	(Tao <i>et al.</i> , 2006)
Carne de ave	Acetonitrila/ ácido acético	⁴ GC- NPD	90	0,5 ng g ⁻¹ / NR	(Wang, 2001)
Carne de ave	Acetato de etila	⁵ HPLC- UV	72,7-83,8	0,2 µg kg ⁻¹ / 0,7 µg kg ⁻¹	(Sun <i>et al.</i> , 2007)
Salmão	Acetato de etila	LC- MS/MS	101	0,2 µg kg ⁻¹ / NR	(Sakamoto <i>et al.</i> , 2011)
Carne suína	Acetato de etila	HPLC- UV	71,8-85,6	0,2 µg kg ⁻¹ / 0,7 µg kg ⁻¹	(Sun <i>et al.</i> , 2007)

¹UHPLC- MS/MS-Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas; ²HPLC- MS/MS-Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas; ³LC- MS/MS- Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas; ⁴GC- NPD-Cromatografia gasosa acoplada à detector de nitrogênio-fósforo.

Os métodos cromatográficos relatados necessitam de pré-tratamento da amostra e demoradas etapas de extração antes da análise de RNZ. Além disso, estes métodos exigem equipamentos caros e habilidades consideráveis são necessárias para operá-los com sucesso (El-Desoky *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de métodos de triagem que forneçam informações analíticas rápidas são de grande importância. Os métodos analíticos convencionais geralmente são mais demorados, pois estes são projetados para fornecer informações qualitativas e quantitativas detalhadas sobre os analitos na amostra, o que normalmente não é obrigatório para respostas rápidas (Moretti *et al.*, 2016; Toledo *et al.*, 2007).

As técnicas voltamétricas são uma excelente alternativa aos métodos analíticos convencionais, principalmente devido ao baixo custo e curto prazo para realizar os ensaios (Souza, Machado, 2006), destacando em particular, a possibilidade de realizar medidas diretas na maioria dos casos, sem necessidade de separação prévia ou etapas de tratamento (Galli *et al.*, 2006).

Devido à ausência de métodos eletroanalíticos relatados anteriormente para a determinação de RNZ em carne bovina, no presente estudo, um método de triagem inédito, rápido e simples foi desenvolvido e validado, baseado em estudos voltamétricos com recuperação e limites de detecção satisfatórios para sua aplicação como método de triagem na determinação de RNZ em carne bovina.

Material e métodos

Reagentes e solução estoque de RNZ

Todos os reagentes utilizados nesse trabalho foram de pureza grau analítico (P.A) e sem nenhuma etapa prévia de purificação. RNZ (CAS Number 7681-76-7) foi obtido da Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA) como um padrão analítico. Uma solução estoque de RNZ ($4,000 \text{ g L}^{-1}$ ou $20,00 \text{ mmol L}^{-1}$) foi preparada em água ultrapura com resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ (Milli-Q System, Millipore, USA) e foi armazenada sob refrigeração.

Também foi utilizada água ultrapura em todos os ensaios eletroquímicos, no preparo das outras soluções e para a construção das curvas analíticas. Para a avaliação de possíveis eletrólitos de suporte, cloreto de potássio (85%), hidróxido de

potássio (99%), fosfato de sódio monobásico ($\geq 98\%$) e fosfato de sódio dibásico (99%) foram adquiridos da Vetec.

Obtenção das amostras e preparo do extrato de carne bovina

As amostras de carne moída (patinho) frescas foram adquiridas no comércio local da cidade de Viçosa (Minas Gerais, Brasil). Em um liquidificador doméstico foi homogeneizado 5,000 g de carne bovina moída com 25,0 mL de tampão fosfato $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ utilizado como eletrólito de suporte. A mistura foi filtrada em papel de filtro Quanty® com 9,0 cm de diâmetro e $25,0 \mu\text{m}$ de porosidade, como mostrado na Figura 2. O filtrado obtido foi utilizado como extrato de carne bovina e preparado diariamente.

Alíquotas adequadas de solução padrão e do extrato foram sempre preparadas no dia da análise e adicionadas à célula eletroquímica, para posteriores medidas voltamétricas.

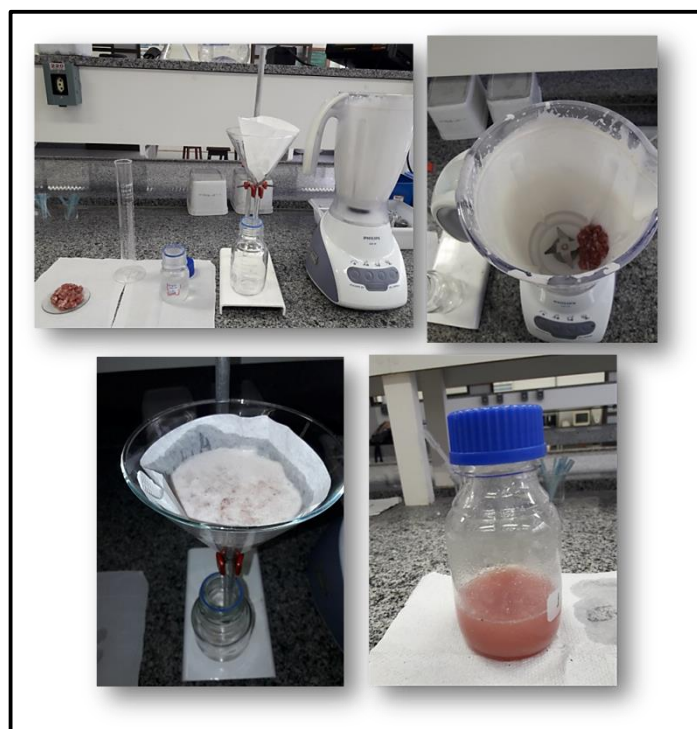


Figura 2. Preparo do extrato contendo a matriz carne bovina.

Instrumentação

Todas as medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT 128 N Autolab potentiostat (Eco-Chemie,

Utrecht, The Netherlands) interfaciado a um microcomputador pelo software General Purpose Electrochemical System (GPES, versão 4.9). Para todas as medidas utilizou-se uma célula eletroquímica convencional de 50,00 mL com uma tampa de Teflon® equipada com um conjunto de três eletrodos, incluindo o eletrodo de referência Ag | AgCl, KCl_{sat.} 3,0 mol L⁻¹, um fio de platina como eletrodo auxiliar e um eletrodo de carbono vítreo (GCE) como eletrodo de trabalho, com uma área superficial de 0,127 cm². Todos os eletrodos foram adquiridos da Metrohm® (Suíça).

O oxigênio foi removido por borbulhamento de gás nitrogênio durante 5 minutos antes de cada ensaio. A superfície do eletrodo de trabalho foi polida com alumina de 0,3 μm (Buehler, EUA) entre cada repetição por 1 minuto e em seguida enxaguada com água purificada.

Avaliação do comportamento voltamétrico de RNZ

Devido à ausência de estudos voltamétricos anteriores do antiparasitário, primeiramente foi realizada uma investigação sobre a eletroatividade de RNZ 2,00 mmol L⁻¹. Para isso empregou-se a técnica de voltametria cíclica e foram examinadas diferentes faixas de potencial nos sentidos anódico e catódico em tampão fosfato 0,100 mol L⁻¹ pH 6,5 como eletrólito de suporte e GCE como eletrodo de trabalho. Alguns ensaios por voltametria cíclica foram utilizados como critérios de diagnóstico para o comportamento voltamétrico do analito, como a realização de varreduras sucessivas sem o polimento da superfície do eletrodo de trabalho e a variação da taxa de varredura (ν). Todos os ensaios foram realizados a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) e em triplicata.

Otimização das condições de análise para RNZ

A solução aquosa de RNZ 2,00 mmol L⁻¹ foi testada por VC e GCE na faixa de potencial entre (E_{pc}) de -1,20 V < E_{pc} < -0,30 V vs. Ag | AgCl, KCl_{sat.} 3,0 mol L⁻¹ em quatro soluções de eletrólito de suporte por DPV, a fim de se estabelecer em qual solução o analito proporcionaria a maior intensidade de corrente de pico catódico (I_{pc}) e menor valor de potencial de pico catódico (E_{pc}).

A fim de obter maior sensibilidade e seletividade nas análises voltamétricas quantitativas, realizou-se um estudo de otimização de parâmetros instrumentais para as técnicas de voltametria de pulso diferencial (DPV) e voltametria de onda quadrada (SWV). Todas as medidas foram realizadas utilizando testes univariados em solução

de RNZ 2,00 mmol L⁻¹ em eletrólito de suporte tampão fosfato 0,100 mol L⁻¹ pH 6,5. Em ambas as técnicas, três parâmetros foram examinados, utilizando GCE como eletrodo de trabalho.

Os critérios definidos para escolha da técnica foram: maior intensidade de corrente de pico, menores desvios de I_{pc} entre as repetições e menores valores de $W_{1/2}$.

Validação do método e aplicação em amostras de carne bovina

Após otimização dos parâmetros voltamétricos e do eletrólito de suporte, duas curvas analíticas foram construídas, na ausência e na presença de carne bovina, pela adição de alíquotas da solução estoque de RNZ em concentrações finais variando entre 0,625 mg kg⁻¹ e 4,375 mg kg⁻¹ na célula contendo o eletrólito de suporte. Foram aplicadas regressões lineares para cada curva pelo método de mínimos quadrados e todos os ensaios foram realizados a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) e pelo menos em triplicata.

O efeito de matriz foi avaliado estatisticamente aplicando o teste *t-student* a 95% de confiança (Meier & Zünd 2000), utilizando a equação apresentada:

$$t_{calc} = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{s(a_1)^2 + s(a_2)^2}} \quad (1)$$

Onde a_1 e a_2 são as inclinações das curvas analíticas na ausência e presença de matriz carne bovina, respectivamente. $s(a_1)$ e $s(a_2)$ são estimativas de desvio padrão da inclinação. O valor t calculado foi comparado com o valor de t crítico determinado em uma tabela de *t-student* a 95% de confiança, respeitando o grau de liberdade da análise.

A fim de assegurar a confiabilidade dos resultados do método desenvolvido, foram determinadas algumas figuras de mérito. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir das equações 1 e 2, respectivamente:

Os valores de LD e LQ para RNZ foram calculados com as Equações 1 e 2, a partir do desvio padrão absoluto da corrente elétrica (S_b), medidas exatamente na E_{pc} do analito após 12 varreduras realizadas no branco, e a inclinação (b) da curva analítica. (MAPA, 2011; Ribani *et al.*, 2004)

$$LD = \frac{3.S_b}{b} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{10.S_b}{b} \quad (2)$$

Em que S_b é o desvio padrão absoluto da corrente elétrica medidas exatamente no E_{pc} do analito após 12 varreduras realizadas no branco e b corresponde às inclinações das curvas analíticas construídas na ausência e presença de matriz.

Também foram avaliados a linearidade, precisão e exatidão, conforme recomendação de agências regulatórias brasileiras (ANVISA, 2003; INMETRO, 2010; MAPA, 2011) da literatura (Paschoal *et al.*, 2008; Ribani *et al.*, 2004) e a IUPAC 1978.

Resultados e discussão

Comportamento voltamétrico de RNZ

O principal objetivo dos estudos preliminares foi a caracterização de possíveis processos de oxidação-redução de soluções aquosas RNZ de 2,00 mmol L⁻¹ por voltametria cíclica (VC) em tampão fosfato 0,100 mol L⁻¹ pH 6,5 como eletrólito de suporte e GCE como eletrodo de trabalho. Foram examinadas diferentes faixas de potencial nos sentidos anódico e catódico, até ser observado um pico em aproximadamente $E_{pc} = -0,742$ V vs. Ag|AgCl, KCl_{sat.} 3,0 mol L⁻¹ a uma taxa de varredura de 100 mV s⁻¹, dentro do intervalo do potencial negativo (E_{pc}) de -1,20 V < E_{pc} < -0,30 V vs. Ag | AgCl, KCl_{sat.} 3,0 mol L⁻¹. Este pico foi atribuído como o pico de redução do antiparasitário, conforme apresentado na Figura 3A.

Ensaio de varreduras sucessivas por VC sem polir a superfície do eletrodo de trabalho mostram a diminuição da intensidade da corrente de pico catódico (I_{pc}) em aproximadamente 78% entre o 1º e o 10º ciclos, como indicado na Figura 3B. Esse fenômeno ocorre devido à possível adsorção de RNZ ou seu produto de redução na superfície do eletrodo de trabalho. Para evitar tal deposição, a limpeza mecânica da superfície do eletrodo foi realizada manualmente antes de cada medição. Consequentemente, para fins analíticos, foi registrado o voltamograma que correspondia ao primeiro ciclo em -0,742 V.

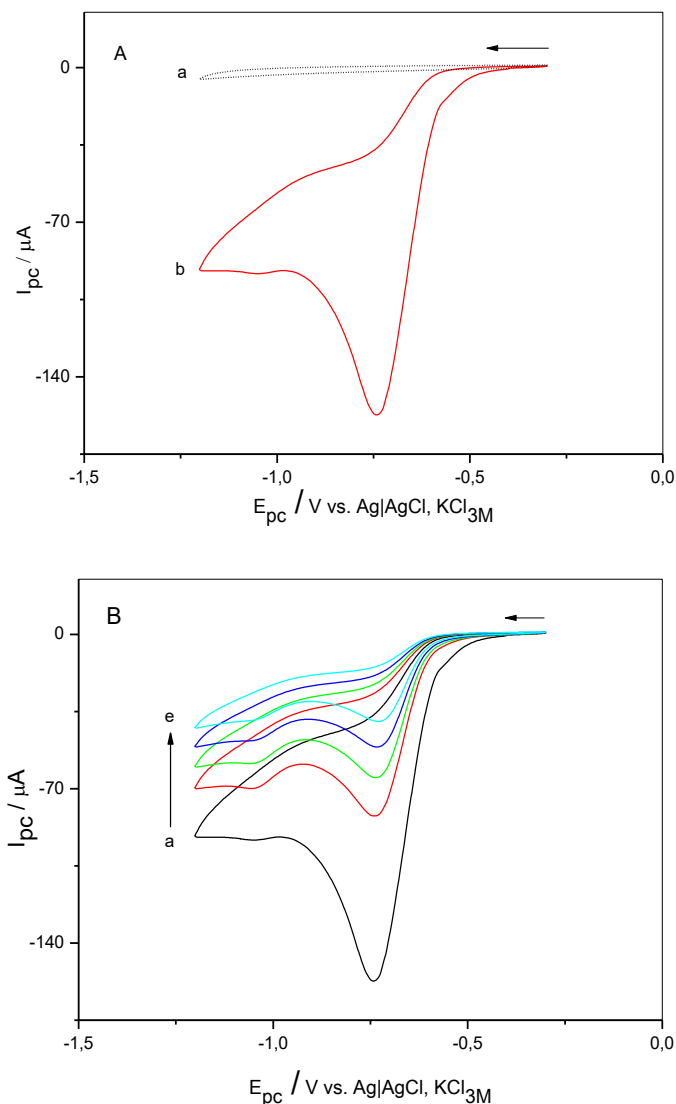


Figura 3. (A) Voltamograma cíclico do (a –)branco e (b –) solução de RNZ 2,00 mmol L⁻¹; (B) Voltamogramas cíclicos sucessivos de solução aquosa de RNZ 2,00 mmol L⁻¹: (a –) 1^o ciclo; (b –) 2^o ciclo; (c –) 3^o ciclo; (d –) 5^o ciclo; (e –) 10^o ciclo, em velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹ com tampão fosfato 0,100 mol L⁻¹ pH 6,5 e eletrodo de carbono vítreo

O comportamento eletroquímico de RNZ também foi examinado com VC variando a taxa de varredura (v) entre 10 mV s⁻¹ e 500 mV s⁻¹. Uma relação linear ($r^2 = 0,9935$) entre a corrente de pico catódico (I_{pc}) e a raiz quadrada da taxa de varredura ($v^{1/2}$) é observada na Figura 4A, o que indica que o principal mecanismo de transferência de massa para a redução do composto orgânico é a difusão no interior da solução para a superfície do eletrodo de trabalho. (Bard, Faulkner, 2001) Na Figura 4B, está representada a relação entre a função corrente ($I_{pc} / v^{1/2}$) e diferentes velocidades de varredura (v).

É possível observar que os valores de $(I_{pc} / v^{1/2})$ são praticamente independentes de v , sugerindo que a transferência eletrônica no processo catódico é irreversível. (Nicholson, Shain, 1964).

A Figura 4C apresenta a relação linear obtida entre $(\log I_{pc} \text{ vs. } \log v)$ com inclinação da reta $\sim 0,5$ indicando assim um processo de transferência de massa controlado majoritariamente por difusão (Bard, Faulkner 2001) reafirmando a indicação obtida pela relação linear entre I_{pc} e $v^{1/2}$. Apesar disso, o coeficiente linear diferente de zero indica, mesmo que de forma secundária, a existência de um processo de adsorção na superfície do eletrodo de trabalho.

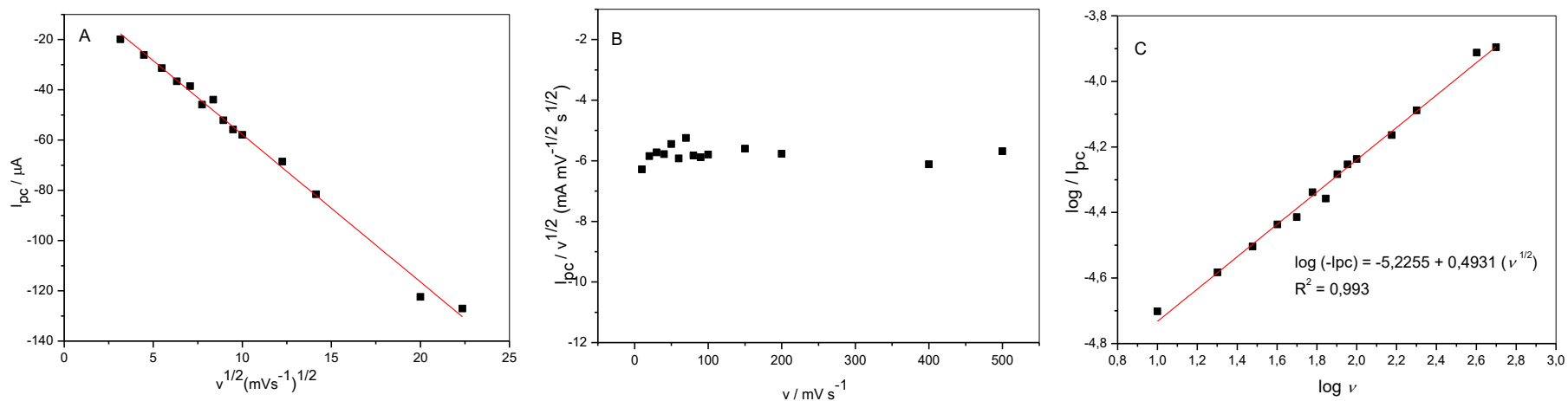


Figura 4. (A) Intensidade da corrente de pico catódico (I_{pc}) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$); (B) Dependência da função corrente ($I_{pc}/v^{1/2}$) com a velocidade de varredura de potencial; (C) Variação do logaritmo da corrente de pico catódico em função do logaritmo da velocidade de varredura em VC para uma solução de RNZ $2,00 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 6,5, utilizando eletrodo de carbono vítreo (GCE).

Proposta de mecanismo para a redução de RNZ em GCE

Em trabalhos encontrados na literatura acerca da transferência eletrônica que ocorre durante o processo de oxidorredução dos diferentes derivados de nitroimidazóis, observa-se uma diferença no comportamento voltamétrico de tais compostos, que depende principalmente do meio em que é realizado o ensaio. Em meio aprótico, 2-nitroimidazol e 4-nitroimidazol apresentaram dois picos de redução bem definidos por voltametria cíclica, sendo que o primeiro pico ocorre a partir de uma transferência de quatro elétrons e o segundo pico a partir de uma transferência de um elétron (Roffia *et al.*, 1982; Squella *et al.*, 2006).

Por polarograma de pulso diferencial e voltametria cíclica, 4-nitroimidazol em meio ácido apresentou um pico de redução a partir da transferência de quatro elétrons e em meio básico o composto apresentou dois picos de redução também a partir da transferência de quatro elétrons, para produzir a hidroxilamina derivada (Bollo *et al.*, 2010; Carbajo *et al.*, 2002).

Compostos 5-nitroimidazólicos, como é o caso de RNZ, quando analisados por voltametria cíclica apresentaram um pico de redução e nenhum pico de oxidação, indicando transferência eletrônica irreversível para os processos. Tal redução atribui-se à transferência de quatro elétrons do grupo nitro (-NO₂) para o grupo hidroxilamina correspondente (-NHOH) (Gui *et al.*, 2011).

Por polarograma de pulso diferencial, metronidazol apresentou dois picos de redução em meio ácido e apenas um pico em meio básico (Brett *et al.*, 1997). Leach *et al.* (1981) também relataram a presença de um pico de redução de metronidazol em meio neutro em $E_{pc} = -0,465$ V (Leach *et al.*, 1981). Em ambos os trabalhos, os autores relataram a transferência de seis elétrons durante a redução do composto. Neste caso, o mecanismo de redução ocorre em três etapas, sendo que em cada uma delas, ocorre a transferência de 2 elétrons. A hidroxilamina derivada é formada a partir das duas primeiras etapas de redução, em seguida, na terceira etapa, ocorre a formação da amina correspondente.

Devido à semelhança entre as estruturas químicas de RNZ e metronidazol, neste trabalho, considerou-se o mecanismo de transferência eletrônica para a redução eletroquímica de RNZ o mesmo apresentado na Figura 5:

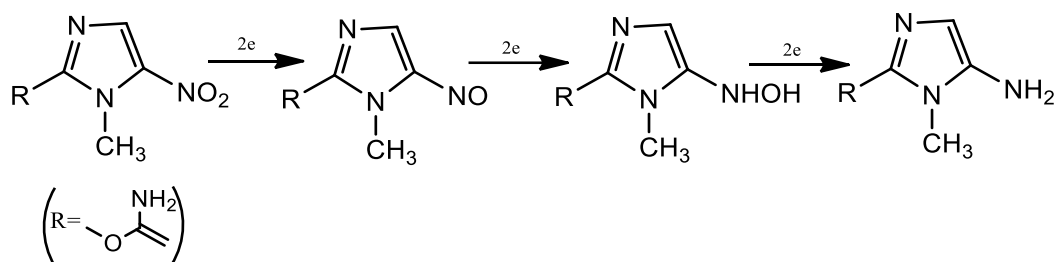


Figura 5. Proposta de mecanismo para redução eletroquímica de RNZ em GCE.

Fonte: Adaptado de Brett *et al.*, 1997

Ajuste do eletrólito de suporte por DPV

O primeiro parâmetro a ser estabelecido foi em qual solução de eletrólito de suporte que o analito proporcionaria a maior intensidade de corrente. Para isso, quatro soluções de eletrólito de suporte foram testadas: KCl 0,100 mol L⁻¹, KOH 0,100 mol L⁻¹, tampão fosfato de 0,100 mol L⁻¹ pH 6,5 e HCl 0,100 mol L⁻¹ (onde ocorreu ausência de pico catódico). De acordo com o gráfico de distribuição de espécies de RNZ ($pK_a=1,32$) (Moral-Rodríguez *et al.*, 2016), pode-se concluir que a espécie é completamente desprotonada para $pH > 2,5$ (α_1) (Figura 6).

Em vista disso, é inviabilizada a investigação sobre o comportamento do composto em pH inferior a 2,5 caso em que a molécula se encontra na forma protonada (α_0). É possível inferir que nos demais eletrólitos, a espécie eletroativa é a base conjugada e por isso a ausência de picos ao utilizar HCl 0,10 mol L⁻¹ como eletrólito de suporte. Este estudo baseou-se nos cálculos realizados com a planilha AlfaDist 12 versão 7, que foi originalmente projetada por Oliveira (Oliveira, 2017).

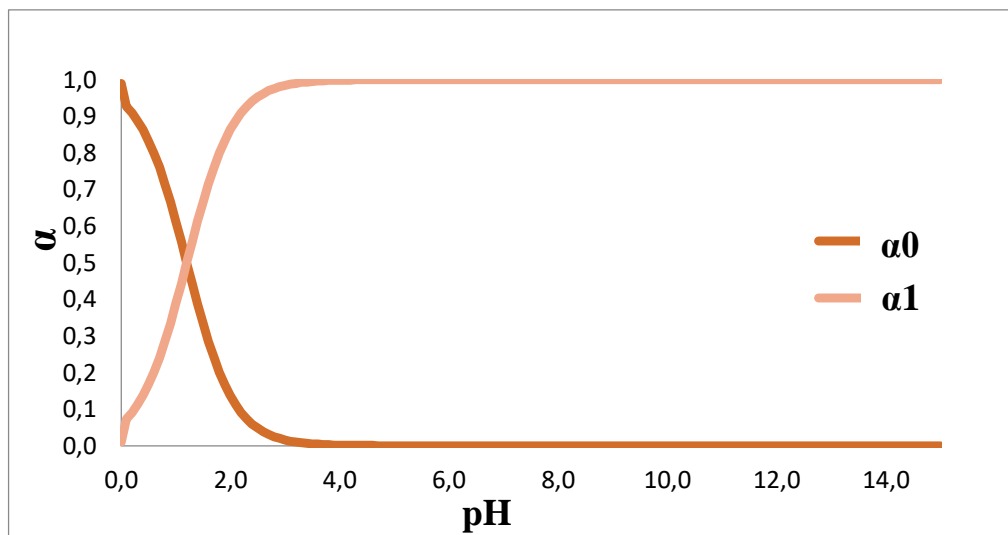


Figura 6. Diagrama de distribuição de espécies para o RNZ; α_0 é o grau de dissociação da espécie protonada.

Fonte: Adaptado de Oliveira, 2017

Alguns aspectos como corrente (I_p), potencial (E_p) e largura de pico à meia altura ($W_{1/2}$) podem contribuir com a escolha do eletrólito de suporte a ser utilizado no desenvolvimento de um método voltamétrico. Maiores valores de I_p promovem maior sensibilidade, enquanto menores valores de E_p e $W_{1/2}$ representam maior seletividade do método desenvolvido.

Como pode ser observado na Figura 7, a solução de tampão fosfato 0,100 mol L⁻¹ pH 6,5 além de apresentar maior intensidade de I_{pc} , em relação às outras soluções testadas, apresentou o mesmo valor de largura de pico à meia altura ($W_{1/2}$) que a solução de KOH 0,100 mol L⁻¹, entretanto a I_{pc} seja cerca de quatro vezes maior. Quanto ao E_{pc} , a solução de tampão fosfato 0,100 mol L⁻¹ pH 6,5 apresentou menores valores, comparado às outras soluções.

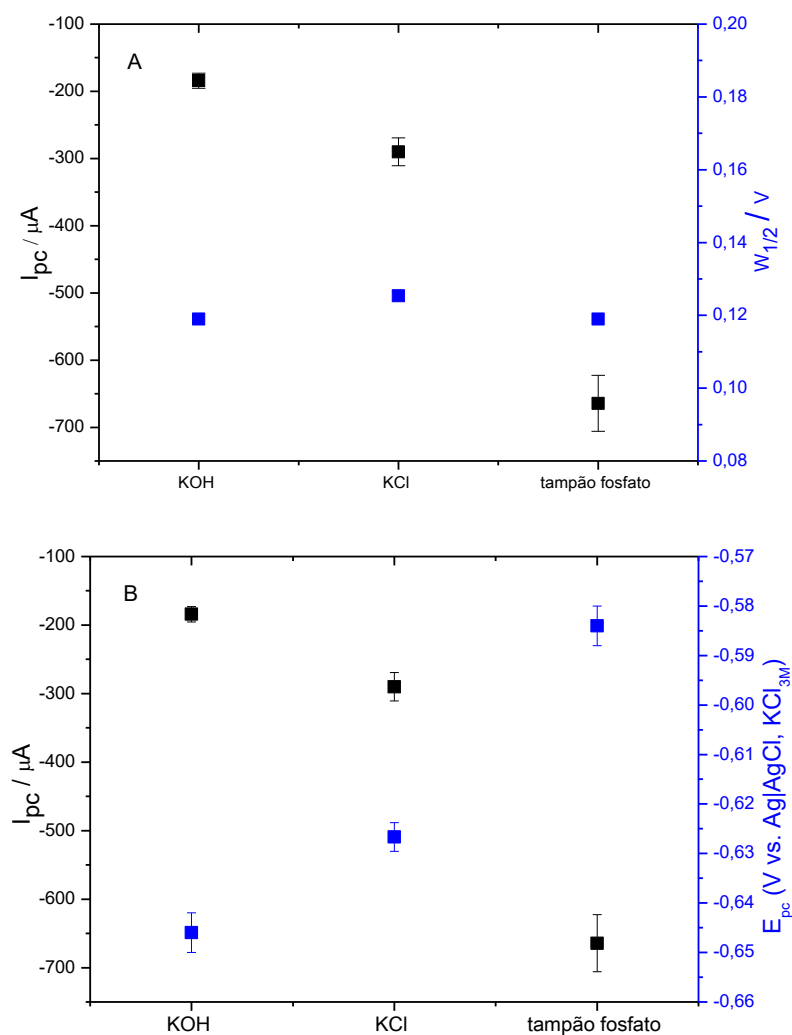


Figura 7. (A) Variação de $W_{1/2}$ e I_{pc} em diferentes eletrólitos suportes KOH 0,100 mol L⁻¹, KCl 0,100 mol L⁻¹ e tampão fosfato 0,100 mol L⁻¹ pH 6,5 e (B) Variação de E_{pc} e I_{pc} em diferentes eletrólitos suportes KOH 0,100 mol L⁻¹, KCl 0,100 mol L⁻¹ e tampão fosfato 0,100 mol L⁻¹ pH 6,5

As varreduras no sentido catódico revelaram que além de uma melhor resposta voltamétrica, um pico mais definido em $E_{pc} = -0,584$ V foi obtido com a solução de tampão fosfato 0,100 mol L⁻¹ pH 6,5 (Figura 8) que foi então escolhido como eletrólito de suporte para o desenvolvimento do método. Este pico também foi atribuído como o pico de redução do antiparasitário. A ausência de pico catódico na varredura inversa confirma que o processo de redução de RNZ envolveu uma transferência de elétrons irreversível.

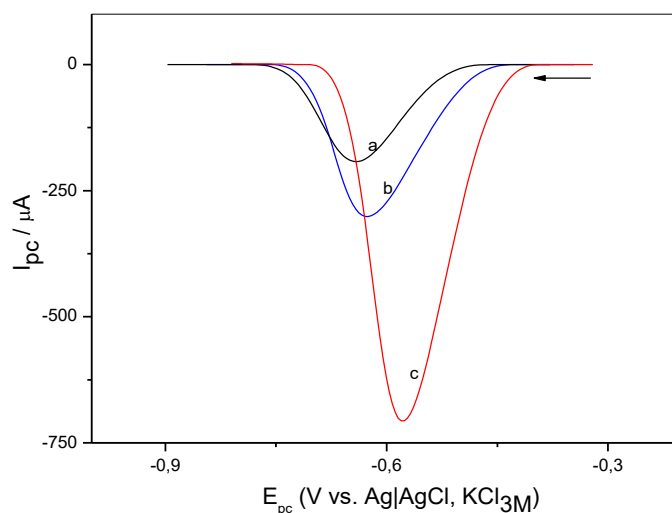


Figura 8. Voltamogramas de pulso diferencial de solução aquosa de RNZ $2,00 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando eletrodo de carbono vítreo em soluções de (a –) KOH $0,100 \text{ mol L}^{-1}$; (b –) KCl $0,100 \text{ mol L}^{-1}$; (c –) tampão fosfato $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,5 como eletrólitos de suporte

Otimização instrumental para DPV e SWV

Um estudo de otimização de parâmetros instrumentais de análise para as técnicas de voltametria de pulso diferencial (DPV) e voltametria de onda quadrada (SWV) foi realizado. Para a escolha das condições instrumentais de análise, os maiores valores de I_{pc} juntamente com os menores valores de largura de pico a meia altura e desvio entre medidas foram os parâmetros considerados ideais para as análises seguintes. Nas Figuras 9A, 9B e 9C observam-se os resultados obtidos em DPV para a variação de I_{pc} e $W_{1/2}$ em função da variação da velocidade de varredura, da amplitude de pulso, e do tempo de pulso, respectivamente.

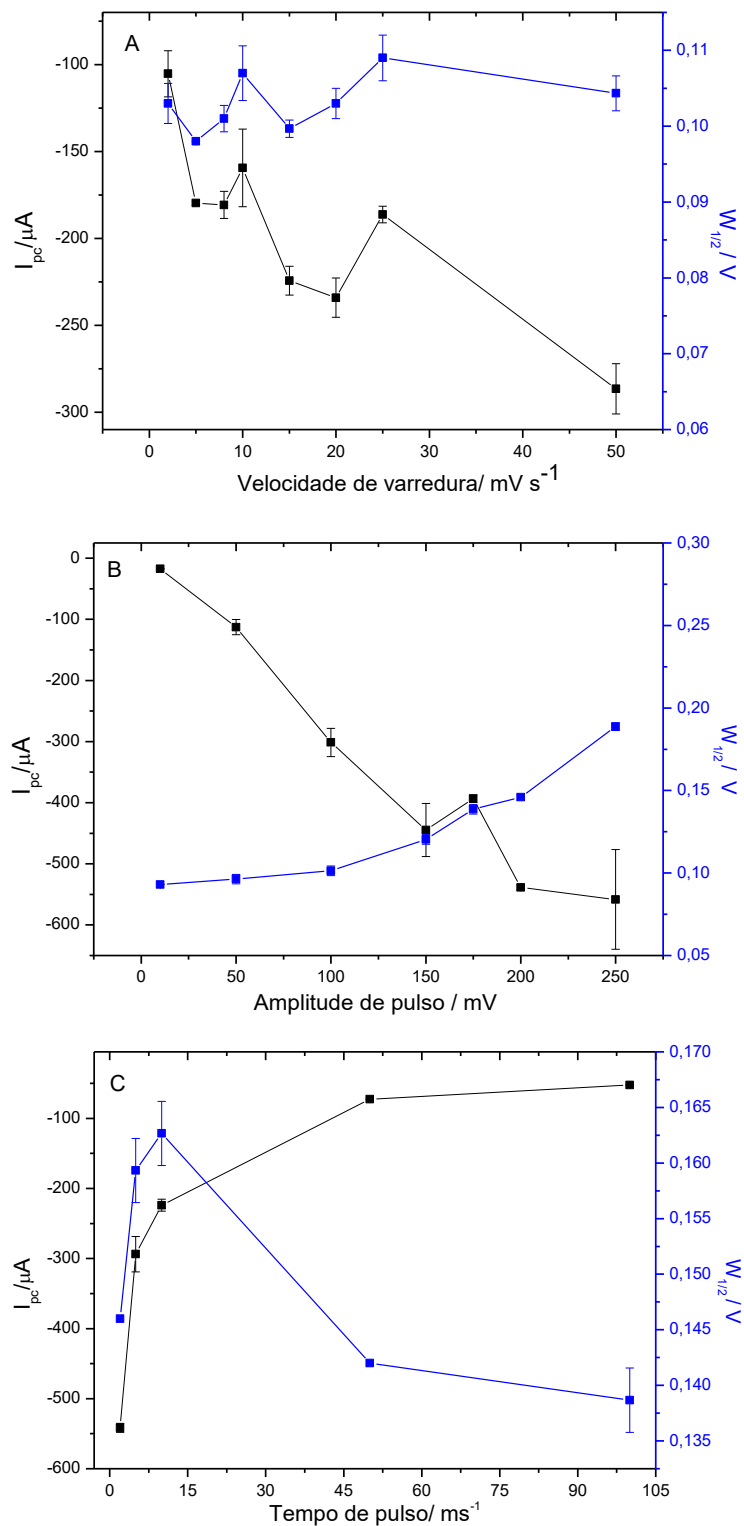


Figura 9. Variação de I_{pc} e largura de pico a meia altura ($W_{1/2}$) em função de (A) velocidade de varredura, (B) amplitude de pulso e (C) tempo de pulso por DPV para solução de RNZ 2,00 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,100 mol L⁻¹ pH 6,5 como eletrólito de suporte

Nas Figuras 10A, 10B e 10C são mostrados os resultados obtidos para I_{pc} e $W_{1/2}$ para análises de RNZ em função da variação de frequência, amplitude de pulso e incremento de varredura na SWV.

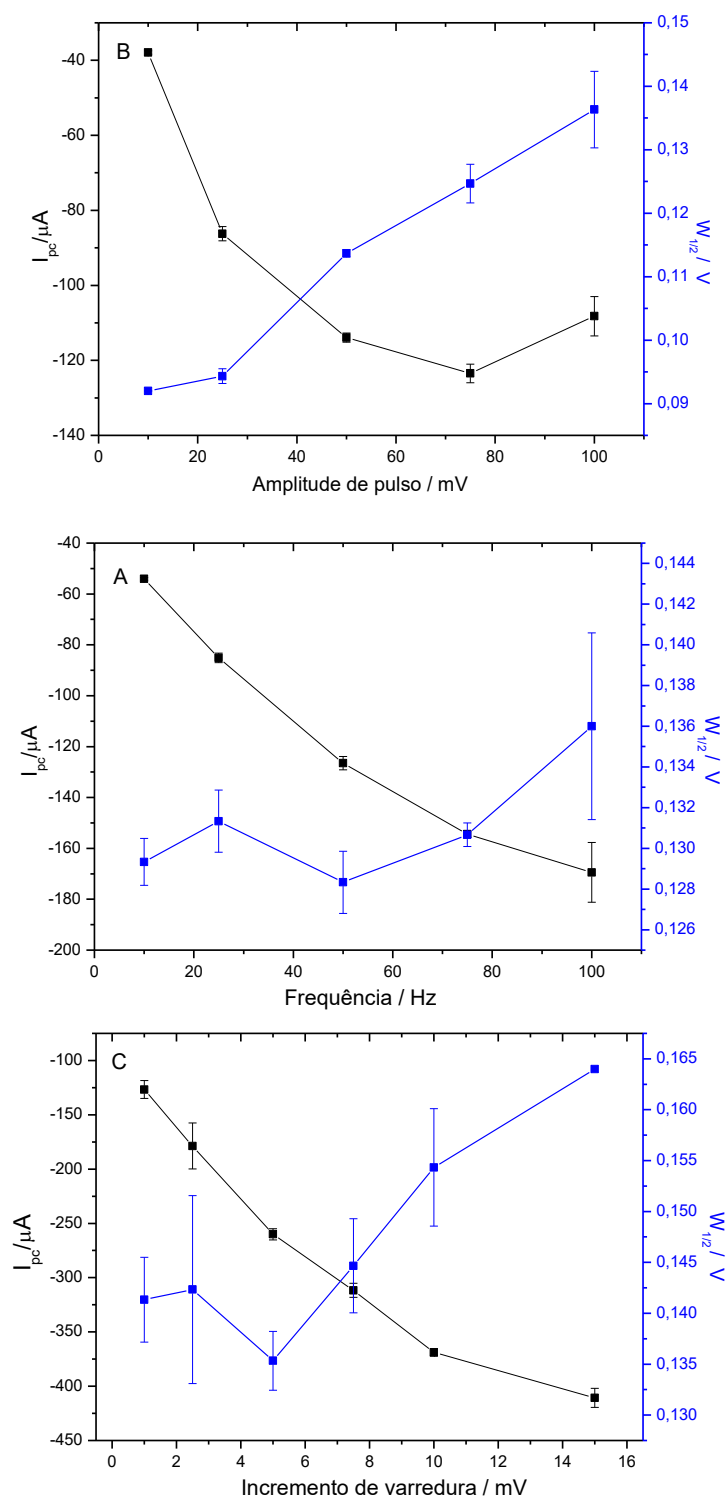


Figura 10. Variação de I_{pc} e largura de pico a meia altura ($W_{1/2}$) em função de (A) frequência de varredura, (B) amplitude de pulso e (C) incremento de varredura por SWV para solução de RNZ 2,00 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,100 mol L⁻¹ pH 6,5 como eletrólito de suporte

Em ambas as técnicas considerou-se os seguintes critérios para escolha de cada parâmetro: maior intensidade de corrente de pico, que está relacionado à maior sensibilidade nas análises, menores desvios de I_{pc} entre as repetições e menores valores de $W_{1/2}$, que estão relacionados à maior seletividade das análises.

Na Tabela 2 está apresentado o intervalo de avaliação e o valor escolhido para cada parâmetro das duas técnicas voltamétricas.

Tabela 2. Parâmetros voltamétricos de DPV e SWV ajustados para análise de RNZ

DPV		
Parâmetro	Faixa de avaliação	Valor escolhido
Velocidade de varredura (mV s^{-1})	2 – 50	25
Amplitude de pulso (mV)	10 – 250	200
Tempo de pulso (ms)	2 – 100	2
SWV		
Parâmetro	Faixa de avaliação	Valor escolhido
Amplitude de pulso (mV)	10 – 100	75
Frequência de pulso (Hz)	10 – 100	75
Incremento de varredura (mV)	1 – 15	15

Após a otimização dos parâmetros, as técnicas de SWV e DPV foram comparadas em uma mesma solução aquosa de RNZ 2,00 mmol L^{-1} com tampão fosfato de 0,100 mol L^{-1} pH 6,5 como eletrólito de suporte conforme apresentado na Figura 11. Dessa maneira foi possível avaliar os resultados obtidos em cada técnica antes de prosseguir para a etapa de quantificação do composto. A DPV se mostrou a técnica mais adequada, pois, além de apresentar aumento significativo (cerca de 30%) de I_{pc} , a técnica DPV também apresentou menores valores de E_{pc} e $W_{1/2}$ comparada à técnica SWV, levando a maior sensibilidade e seletividade do método desenvolvido.

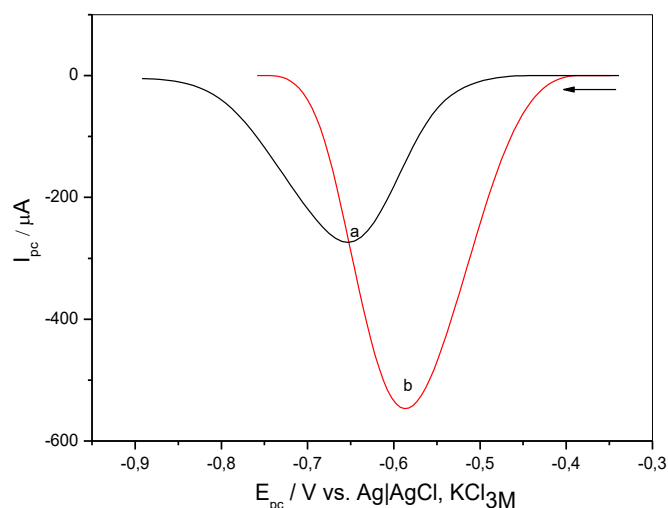


Figura 11. Variação dos voltamogramas para as técnicas (a –) SWV e (b –) DPV após otimização dos parâmetros experimentais, para solução aquosa de RNZ 2,00 mmol L⁻¹ com tampão fosfato 0,100 mol L⁻¹ pH 6,5 como eletrólito de suporte

Determinação de RNZ em extrato de carne bovina e validação do método

A DPV se apresentou como a técnica mais apropriada para a determinação de RNZ em extrato de carne bovina, devido a maior seletividade, sensibilidade e repetitividade, além de fornecer um pico catódico mais definido em $E_{pc} = -0,584$ V vs. Ag|AgCl, KCl_{sat.} 3,0 mol L⁻¹. RNZ foi determinado por DPV (com concentrações variando entre 0,625 e 4,375 mg kg⁻¹) com parâmetros otimizados, visando uma melhor reprodutibilidade eletroquímica.

Curvas analíticas

Duas curvas analíticas foram construídas pelo método de mínimos quadrados, a partir do ajuste linear da relação entre os valores de I_{pc} versus concentração de RNZ usando o método eletroanalítico desenvolvido. Na primeira curva foram utilizados dados de DPV para RNZ na ausência de carne bovina, ou seja, empregando apenas a solução padrão e eletrólito de suporte (Figura 12A). Para a construção da segunda curva analítica foram utilizados os dados de DPV para RNZ na presença da matriz carne bovina, e seu efeito na resposta eletroquímica do analito (Figura 12B). Dentro da faixa de concentração examinada (0,625 a 4,375 mg kg⁻¹), foram obtidas respostas lineares ($r^2 > 0,99$), conforme indicado na Tabela 3.

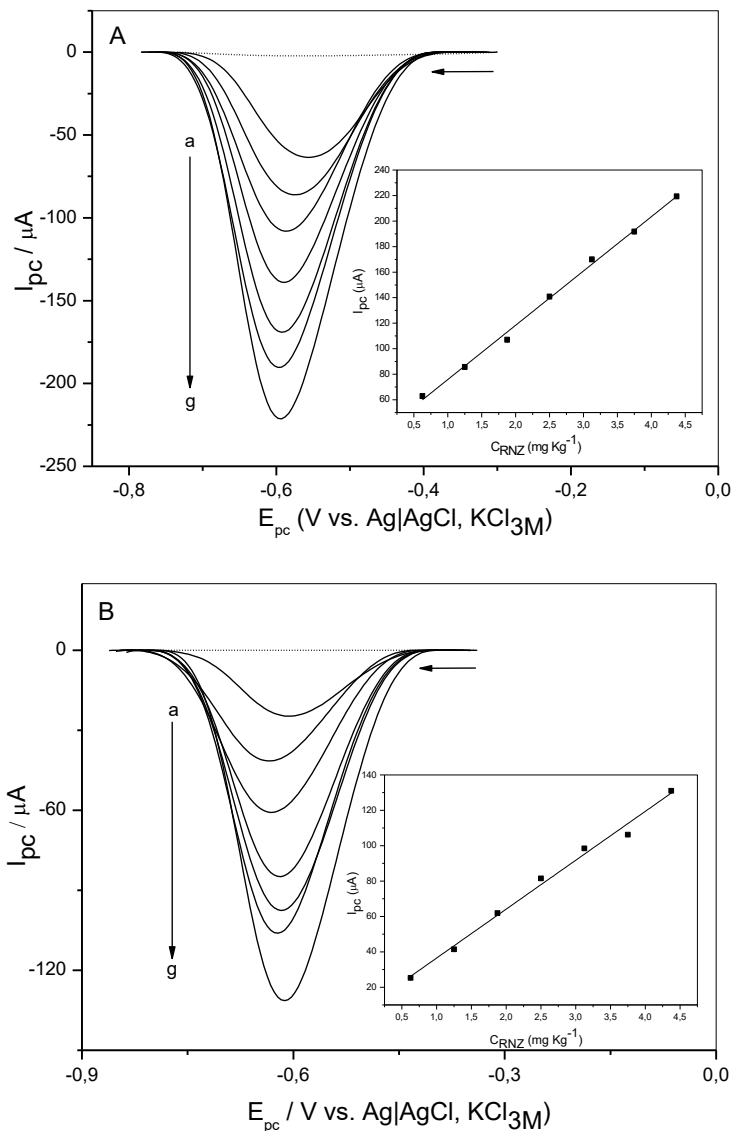


Figura 12. Curvas analíticas para determinação de RNZ na (A) ausência e (B) presença de matriz e efeitos da concentração de analito na relação entre I_{pc} e E_{pc} : (a) $0,625\ mg\ kg^{-1}$; (b) $1,250\ mg\ kg^{-1}$; (c) $1,875\ mg\ kg^{-1}$; (d) $2,500\ mg\ kg^{-1}$; (e) $3,125\ mg\ kg^{-1}$; (f) $3,750\ mg\ kg^{-1}$ e (g) $4,375\ mg\ kg^{-1}$. Condições: GCE com tampão de fosfato $0,100\ mol\ L^{-1}$ em pH 6,5 como eletrólito de suporte.

Quando o ajuste de dados analíticos é linear, como neste trabalho, a sensibilidade é constante dentro desta faixa de trabalho avaliada e pode ser determinada pela inclinação (b) da curva analítica (MAPA, 2011). Nota-se que a sensibilidade é reduzida na presença de matriz, conforme observado pelos resultados na Tabela 3 e na Figura 13.

Tabela 3. Modelos de regressão linear ajustados para obtenção das curvas analíticas para quantificar RNZ por DPV, na presença e ausência de extrato de carne bovina

Matriz	Equação da reta $y = a + bx$	Coefficiente de determinação (r^2)
Ausência	$(I_{pc} / \mu A) = 33,35 + 42,51 [C / (mg\ kg^{-1})]$	0,9962
Extrato de carne bovina	$(I_{pc} / \mu A) = 8,88 + 27,63 [C / (mg\ kg^{-1})]$	0,9900

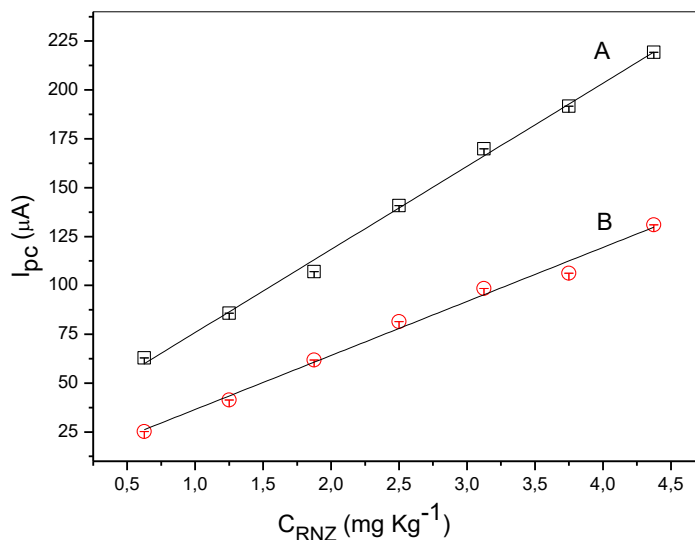


Figura 13. Comparação das curvas analíticas obtidas para determinação de RNZ (A) na ausência e (B) presença de matriz

A fim de verificar a interferência da matriz na resposta eletroquímica de RNZ, foi feita a comparação entre as inclinações das curvas analíticas obtidas na ausência e presença de matriz. O efeito de matriz foi avaliado, estatisticamente, pelo teste *t-student* a 95% de confiança (Meier & Zünd 2000). O valor *t* calculado (9,57) se apresentou maior que o valor *t* crítico (2,23) ($p < 0,05$) o que confirma a existência de efeito de matriz. Pode-se então inferir que a matriz afeta negativamente a sensibilidade do método desenvolvido para determinação de RNZ.

Uma vez que um efeito de matriz está envolvido na análise deste composto, o método de adição de padrão deve ser aplicado.

Linearidade

A avaliação da linearidade foi realizada por meio da análise do coeficiente de determinação e da análise dos gráficos dos resíduos. Como mostrado na Tabela 3, as curvas analíticas construídas na ausência e presença da matriz extrato de carne

bovina mostraram coeficientes de determinação maiores que 0,990, como recomendado, (ANVISA, 2003) caracterizando o bom ajuste aos dados experimentais, e linearidade do método proposto.

A Figura 14 representam os gráficos de resíduos referentes ao ajuste linear de I_{pc} vs. C_{RNZ} , na ausência (a) e na presença (b) da matriz, para RNZ. Observa-se que os resíduos distribuem-se simétrica e aleatoriamente ao redor de zero, indicando um ajuste satisfatório. (MAPA, 2011; Paschoal *et al.*, 2008)

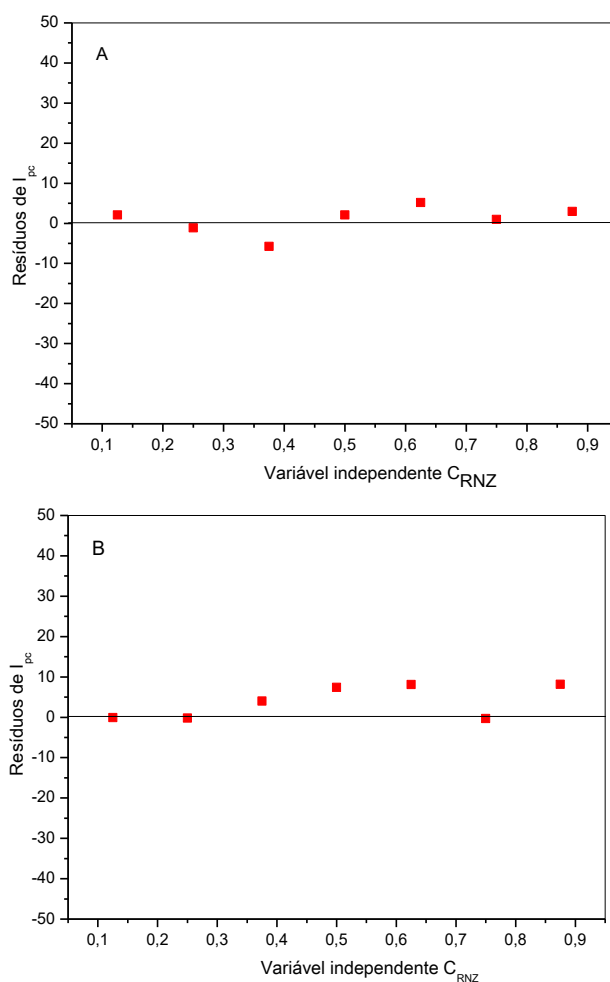


Figura 14. Gráfico de resíduos dos ajustes das respostas instrumentais I_{pc} em função da concentração para a curva analítica construída para quantificação de RNZ na (A) ausência e (B) presença de matriz.

Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os valores de LD e LQ para RNZ foram calculados com as Equações 1 e 2, a partir do desvio padrão absoluto da corrente elétrica (S_b), medidas exatamente no E_{pc}

do analito após 12 varreduras realizadas no branco, e a inclinação (b) da curva analítica. (MAPA, 2011-a; Ribani *et al.*, 2004)

$$LD = \frac{3.S_b}{b} \quad (2)$$

$$LQ = \frac{10.S_b}{b} \quad (3)$$

Tabela 4. Limites de detecção e quantificação e outros parâmetros analíticos

Matriz	¹ S _b	² b	LD		
			(µg L ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)	(µmol L ⁻¹)
Ausência	0,88	42,51	12,40	–	0,0619
Presença	0,99	27,63	21,40	0,107	0,1069

Matriz	¹ S _b	² b	LQ		
			(µg L ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)	(µmol L ⁻¹)
Ausência	0,88	42,51	41,40	–	0,2068
Presença	0,99	27,63	71,60	0,358	0,3577

¹S_b- desvio padrão absoluto da corrente elétrica; ²b- inclinação da curva analítica

Como observado, os valores de LD e LQ se apresentaram acima que o LMR (3,0 µg kg⁻¹) para RNZ em carne bovina. Entretanto, se tratando de um método voltamétrico de triagem, esses valores se mostram favoráveis, uma vez que, o método desenvolvido é rápido, simples e têm o objetivo de fornecer informações preliminares acerca da presença de RNZ em amostras de carne bovina, antecedendo análises quantitativas mais detalhadas.

Precisão

A precisão do método foi avaliada por meio da repetitividade (precisão intra-dia) e da precisão intermediária (precisão inter-dia) utilizando soluções de extrato de carne bovina e adições simultâneas de RNZ em três níveis de concentrações da faixa linear (0,625 mg kg⁻¹, 2,500 mg kg⁻¹ e 3,750 mg kg⁻¹).

A repetitividade está associada a medidas de uma única amostra em diferentes soluções (n = 10) preparadas no mesmo dia, e a precisão intermediária é aplicada

para repetições entre soluções ($n = 5$) preparadas em dias diferentes. Estes valores foram expressos pelo coeficiente de variação (CV), de acordo com a equação:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (4)$$

Em que S é o desvio padrão relativo entre as medidas voltamétricas e X é a média aritmética das medidas voltamétricas. A metodologia desenvolvida apresentou valores máximos de CV de 4,03% e 6,78% para repetitividade e precisão intermediária, respectivamente, que estão em acordo com o prescrito pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (Tabela 5). (MAPA, 2011-b)

Exatidão

Para avaliar a exatidão do método, os procedimentos analíticos seguiram os ensaios de recuperação usando a técnica de adição padrão, visto que o método proposto neste trabalho apresentou efeito de matriz. Alíquotas de extratos de carne bovina foram intencionalmente contaminadas com RNZ em três níveis distintos de concentrações, isto é, $0,625 \text{ mg kg}^{-1}$, $2,500 \text{ mg kg}^{-1}$ e $3,750 \text{ mg kg}^{-1}$, todas dentro da faixa de trabalho da curva analítica construída para amostras na presença de matriz. Para cada amostra contaminada, foram feitas quatro adições de padrão de $0,300 \text{ mg kg}^{-1}$ de solução estoque de RNZ. Os valores de I_{pc} foram obtidos após cada uma das quatro adições de RNZ.

A partir destas medidas foi construída a relação I_{pc} em função da concentração de analito e pelas equações de retas obtidas foi possível determinar a concentração inicial de cada amostra fortificada. As Figuras 15A, 15B e 15C apresentam os gráficos e a regressão linear obtida para RNZ em cada uma das concentrações adicionadas às soluções.

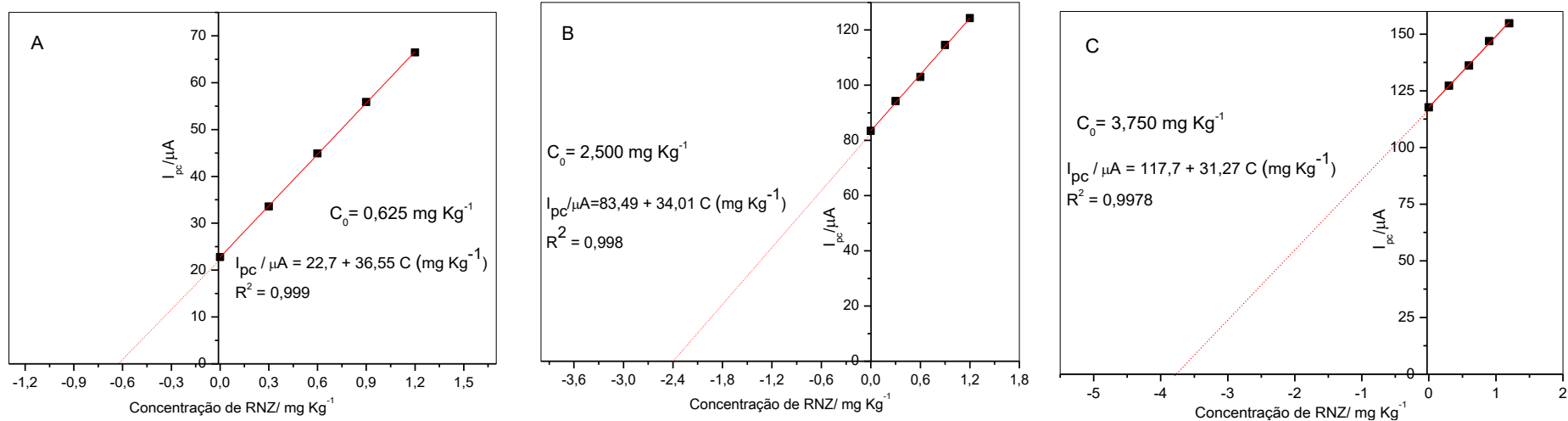


Figura 15. Relações voltamétricas entre I_{pc} e diferentes concentrações de extrato de carne bovina para fortificações de RNZ em (A) $0,625 \text{ mg kg}^{-1}$; (B) $2,500 \text{ mg kg}^{-1}$ e (C) $3,750 \text{ mg kg}^{-1}$

A concentração da contaminação inicial foi, portanto, estimada pela equação de regressão linear obtida das quatro adições de RNZ seguidas após cada amostra ser contaminada. A taxa de recuperação foi determinada em cada ensaio pela relação percentual entre as concentrações reais e estimadas de RNZ nas amostras. As taxas de recuperação para todas as três concentrações investigadas, variam entre 91,4 % e 106%, como são mostradas na Tabela 5. Esses valores se mostram aceitáveis para a aplicação adequada do método com amostras de alimentos de origem animal (entre 80% e 110%) (MAPA, 2011-a; Ribani, 2004).

A recuperação foi determinada para cada nível de contaminação a partir da relação percentual entre a concentração estimada e a concentração real de RNZ nos extratos. Os valores de recuperação para cada nível de concentração encontram-se na Tabela 4. Eles variaram entre 98,1% e 100,3%, mostrando-se aceitáveis para a aplicação adequada do método com amostras de carne bovina (entre 80% e 110%). (MAPA, 2011-a).

Tabela 5. Resultados dos ensaios de recuperação para diferentes concentrações de RNZ

Concentração adicionada / (mg kg ⁻¹)	Concentração determinada/ (mg kg ⁻¹)	Recuperação/ %	Repetitividade/ (CV %)	Precisão intermediária/ (CV %)
0,625	0,621	99,3	2,61	3,21
2,500	2,454	98,1	2,27	4,34
3,750	3,763	100,3	4,03	6,78

Conclusão

Um método voltamétrico de triagem inédito simples, rápido e eficiente foi desenvolvido e aplicado com sucesso na análise do antiparasitário ronidazol (RNZ) em extrato de carne bovina utilizando eletrodo de carbono vítreo (GCE) com tampão fosfato de 0,100 mol L⁻¹ em pH 6,5 como eletrólito de suporte, utilizando aparelhos, instrumentação e reagentes simples. A DPV mostrou ser a técnica mais sensível para determinar RNZ em concentrações até 0,107 mg kg⁻¹ (0,0619 μmol L⁻¹), com boa linearidade, repetitividade e precisão intermediária. A aplicabilidade deste novo método de triagem em amostras de carne bovina é então vantajosamente justificada.

Referências Bibliográficas

ALVES, T. M.; STYNEN, A. P. R.; MIRANDA, K. L.; LAGE, A. P. Campilobacteriose genital bovina e tricomonose genital bovina: Epidemiologia, diagnóstico e controle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 336–344, 2011.

ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Programa Nacional De Análise De Resíduos De Medicamentos Veterinários Em Alimentos Expostos Ao Consumo – **Pamvet**. Brasília, 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 07 de agosto de 2018.

ARAÚJO, F. R.; ROSINHA, G. M. A.; BIER, D.; CHIARI, L.; FEIJÓ, G. L. D.; GOMES, R. C. Segurança do Alimento Carne. **Nota técnica - EMBRAPA**, 2017.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.

BOLLO, S.; JARA-ULLOA, P.; ZAPATA-TORRES, G.; CUTIÑO, E.; STURM, J. C.; NÚÑEZ-VERGARA, L. J.; SQUELLA, J. A. Voltammetric reduction of 4-nitroimidazole derivatives: Influence of the N-1 substitution in protic and aprotic media. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 15, p. 4558–4566, 2010.

BRETT, A. M. O.; SERRANO, S. H. P.; GUTZ, I. G. R.; LA-SCALEA, M. A. Comparison of the Voltammetric Behavior of Metronidazole at a DNA-Modified Glassy Carbon Electrode, a Mercury Thin Film Electrode and a Glassy Carbon Electrode. **Electroanalysis**, v. 9, n. 2, p. 110-114, 1997.

CARBAJO, J.; BOLLO, S.; NÚÑEZ-VERGARA, L. J.; CAMPERO, A.; SQUELLA, J. A. Cyclic voltammetric study of the disproportionation reaction of the nitro radical anion from 4-nitroimidazole in protic media. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 531, n. 2, p. 187–194, 2002.

CHURCH, D. L.; RABIN, H. R.; LAISHLEY, E. J. Reduction of 2-, 4- and 5-nitroimidazole drugs by hydrogenase 1 in clostridium pasteurianum. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 25, n. 1, p. 15–23, 1990.

DUARTE, M.; GIORDANI, R. B.; CARLI, G. A.; ZUANAZZI, J. A.; MACEDO, A. J.; TASCA, T. Cytotoxicity of solubilization vehicles for Trichomonas gallinae and

Tritrichomonas foetus measured by the resazurin microtiter assay. **Veterinary Parasitology**, v. 166, n. 1–2, p. 167–170, 2009.

EL-DESOKY, H. S.; GHONEIM, M. M.; ABDEL-GALEIL, M. M. Stripping voltammetric methods for determination of the antiparasitic drug nitazoxanide in bulk form, pharmaceutical formulation and human serum. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 4, p. 669–679, 2010.

GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105–112, 2006.

GRANJA, R. H. M. M.; NINO, A. M. M.; RECHE, K. V. G.; GIANNOTTI, F. M.; DE LIMA, A. C.; WANSCHER, A. C. B. A.; SALERNO, A. G. Determination and confirmation of metronidazole, dimetridazole, ronidazole and their metabolites in bovine muscle by LC-MS/MS. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 30, n. 6, p. 970–976, 2013.

GUI, Y.; NI, Y. N.; KOKOT, S. Simultaneous determination of three 5-nitroimidazoles in foodstuffs by differential pulse voltammetry and chemometrics. **Chinese Chemical Letters** v. 22, p. 591–594, 2011.

GUO, X. C.; XIA, Z. Y.; WANG, H. H.; KANG, W. Y.; LIN, L. M.; CAO, W. Q.; ZHANG, H. W.; ZHOU, W. H. Molecularly imprinted solid phase extraction method for simultaneous determination of seven nitroimidazoles from honey by HPLC-MS/MS. **Talanta**, v. 166, p. 101–108, 2017.

HERNÁNDEZ-MESA, M.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; CRUCES-BLANCO, C. Novel solid phase extraction method for the analysis of 5-nitroimidazoles and metabolites in milk samples by capillary electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 145, p. 161–167, 2014.

HERNÁNDEZ-MESA, M.; LARA, F. J.; CRUCES-BLANCO, C.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. Determination of 5-nitroimidazole residues in milk by capillary electrochromatography with packed C₁₈ silica beds. **Talanta**, v. 144, p. 542–550, 2015.

INMETRO. Instituto Nacional de Meteorologia, Normalização e Qualidade. Orientação sobre validação de métodos analíticos - DOQ-CGCRE-008 / Revisão 03, 2010.

IUPAC. International Union of Pure Applied Chemistry. **Spectrochimica Acta**, v. 241, 1978.

KUMAR, P.; RÚBIAS, A.; CENTRICH, F.; COMPANYÓ, R. A false positive case due to matrix interference in the analysis of ronidazole residues in muscle tissue using LC-MS/MS. **Meat Science**, v. 97, n. 2, p. 214–219, 2014.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica**. Brasília, p. 73, 2011-a.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de garantia da qualidade analítica**. Brasília, p. 40, 2011-b.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Produtos veterinários**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/exportacao>>. Acesso em 07 de junho de 2017.

MEIER, P. C.; ZÜND, R. E. **Statistical methods in analytical chemistry**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2000.

MORAL-RODRÍGUEZ, A. I.; LEYVA-RAMOS, R.; OCAMPO-PÉREZ, R.; MENDOZA-BARRON, J.; SERRATOS-ALVAREZ, I. N.; SALAZAR-RABAGO, J. J. Removal of ronidazole and sulfamethoxazole from water solutions by adsorption on granular activated carbon: equilibrium and intraparticle diffusion mechanisms. **Adsorption**, v. 22, n. 1, p. 89–103, 2016.

MORETTI, S.; LEGA, F.; RIGONI, L.; SALUTI, G.; GIUSEPPONI, D.; GIOIELLO, A.; MANUALI, E.; ROSSI, R.; GALARINI, R. Multiclass method for the determination of 62 antibiotics in milk. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 1429, p. 792–804, 2016.

MOTTIER, P.; HURÉ, I.; GREMAUD, E.; GUY, P. A. Analysis of four 5-nitroimidazoles and their corresponding hydroxylated metabolites in egg, processed egg, and chicken meat by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 2018–2026, 2006.

NICHOLSON, R. S.; SHAIN, I. Theory of Stationary Electrode Polarography. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems. **Analytical Chemistry**. v. 36, p. 706-723, 1964.

OLIVEIRA, A. F. *AlfaDist* **12** v.7. Disponível em: <<http://www.solucaoquimica.com/alfadist>>. Acesso em 11 de setembro de 2017.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. D. S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190–1198, 2008.

RIBANI, M.; BOTOLLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

ROFFIA, S.; GOTTARDI, C.; VIANELLO, E. Electrochemical behaviour of 4-nitroimidazole and 2-methyl-5-nitroimidazole. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 142, p. 263–275, 1982.

SAKAMOTO, M.; TAKEBA, K.; SASAMOTO, T.; KUSANO, T.; HAYASHI, H.; KANAI, S.; KANDA, M.; NAGAYAMA, T. Determination of dimetridazole, metronidazole and ronidazole in salmon and honey by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v. 52, n. 1, p. 51–58, 2011.

SAMS, M. J; STRUTT, P. R; BARNES, K. A; DAMANT, A. P; ROSE, M. D. Determination of dimetridazole, ronidazole and their common metabolite in poultry muscle and eggs by high performance liquid chromatography with UV detection and confirmatory analysis by atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. **The Analyst**, v. 123, n. 12, p. 2545–2549, 1998.

SILVA, G. R. D.; LIMA J. A.; SOUZA L. F.; SANTOS F. A.; LANA M. A. G.; ASSIS D. C. S.; CANÇADO S. V. Multiresidue method for identification and quantification of avermectins, benzimidazoles and nitroimidazoles residues in bovine muscle tissue by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) using a QuEChERS approach. **Talanta**, v. 171, p. 307–320, 2017.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S. Study of the electrochemical behavior and sensitive detection of pesticides using microelectrodes allied to square-wave voltammetry. **Electroanalysis**, v. 18, n. 9, p. 862–872, 2006.

SQUELLA, J. A.; CAMPERO, A.; MARAVER, J.; CARBAJO, J. Electrochemical reduction of 2-nitroimidazole in aprotic medium: Influence of its dissociation equilibrium on the reduction mechanism. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 2, p. 511–518, 2006.

LEACH, S. C.; WEAVER, R. D.; KINOSHITA, K.; LEE, W. W. POLAROGRAPHIC ANALYSIS OF HETEROCYCLIC NITROGEN COMPOUNDS. v. 129, p. 213–227, 1981.

SUN, H. W.; WANG, F. C.; AI, L. F. Simultaneous determination of seven nitroimidazole residues in meat by using HPLC-UV detection with solid-phase extraction. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 857, n. 2, p. 296–300, 2007.

TAO, D.; JINZHONG, X. U.; CHONGYU, S.; YUAN, J.; HUILAN, C.; BIN, W.; ZENGYUN, Z.; GONGHAI, L. I.; JING, Z.; FEI, L.. Determination of Three Nitroimidazole Residues in Royal Jelly by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Chinese Journal of Chromatography**, v. 24, n. 4, p. 331–334, 2006.

TOLEDO, C.; VALLE, L.; NARVÁEZ, J.; RICHTER, P. Screening method for rapid determination of polychlorinated biphenyls in transformer oil by liquid-liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 937–942, 2007.

WANG, J. H. Determination of three nitroimidazole residues in poultry meat by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. **Journal of Chromatography A**, v. 918, n. 2, p. 435–438, 2001.

XIA, X.; LI, X.; ZHANG, S.; DING, S.; JIANG, H.; SHEN, J. Confirmation of four nitroimidazoles in porcine liver by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 586, p. 394–398, 2007.

ZIMMER, K. R.; SEIXAS, A.; CONCEIÇÃO, J. M.; ZVOBODA, D. A.; BARROS, M. P.; TASCA, T.; MACEDO, A. J.; TERMIGNONI, C. Cattle tick-associated

bacteria exert anti-biofilm and anti-Tritrichomonas foetus activities. **Veterinary Microbiology**, v. 164, n. 1–2, p. 171–176, 2013.

CAPÍTULO 3

Método voltamétrico de triagem para determinação do carrapaticida Fipronil em leite

Resumo

Fipronil (FPN) é um carrapaticida que tem sido amplamente utilizado como uma importante alternativa para o controle de *Rhipicephalus microplus*, conhecido popularmente como “carrapato do boi”. Há grande preocupação quanto à presença de resíduos deste medicamento veterinário em produtos de origem bovina. Um método voltamétrico inédito de triagem foi desenvolvido para determinar resíduos de FPN em leite UHT desnatado, zero lactose utilizando eletrodo de pasta de carbono (CPE) e voltametria de pulso diferencial (DPV). A voltametria cíclica indicou um processo anódico irreversível em aproximadamente em $E_{pa}=+0,700$ V vs. Ag|AgCl, KCl_{sat.} 3,0 mol L⁻¹ em NaOH 0,100 mol L⁻¹ preparada em solução etanol-água 30% (v/v) como eletrólito de suporte. A quantificação de FPN foi realizada por voltametria de pulso diferencial (DPV) e as curvas analíticas foram construídas, obtendo-se limites de detecção (LD) 0,568 mg L⁻¹ e 0,331 mg L⁻¹ e de quantificação (LQ) 1,89 mg L⁻¹ e 1,10 mg L⁻¹ na ausência de matriz e em leite, respectivamente. A taxa de recuperação obtida para três concentrações de FPN em leite UHT desnatado, zero lactose, variou entre 95,3% e 109%. O método se mostrou eficiente para a triagem de FPN em leite.

Palavras-chave: Carrapaticida, leite, técnicas eletroanalíticas, eletrodo de pasta de carbono.

Introdução

Fipronil (FPN) 5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil]-4-[(trifluorometil)sulfinil]pirazol-3-carbonitrila), cuja estrutura molecular é apresentada na Figura 1, é um carrapaticida da família dos pirazóis utilizado no controle de *Rhipicephalus microplus*, conhecido popularmente como carrapato do boi. Classificado como carrapaticida de contato, FPN é aplicado ao rebanho por meio de pulverização, imersão ou “pour on” (Furlong, *et al.*, 2007). O uso inadequado de FPN pode causar a contaminação de produtos de origem bovina. De acordo com o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC) de 2017 publicado por meio da instrução normativa nº20, de 26 de julho de 2018, o limite máximo de referência de FPN em leite bovino é 20 µg L⁻¹. (MAPA, 2018) Na agricultura, FPN é utilizado para controlar várias pragas, atuando como cupinicida, inseticida e formicida nas culturas de batata, cana-de-açúcar, milho, algodão, arroz, eucalipto, soja, amendoim, cevada, feijão, girassol, pastagens, sorgo, soja e trigo (Jiménez *et al.*, 2007).

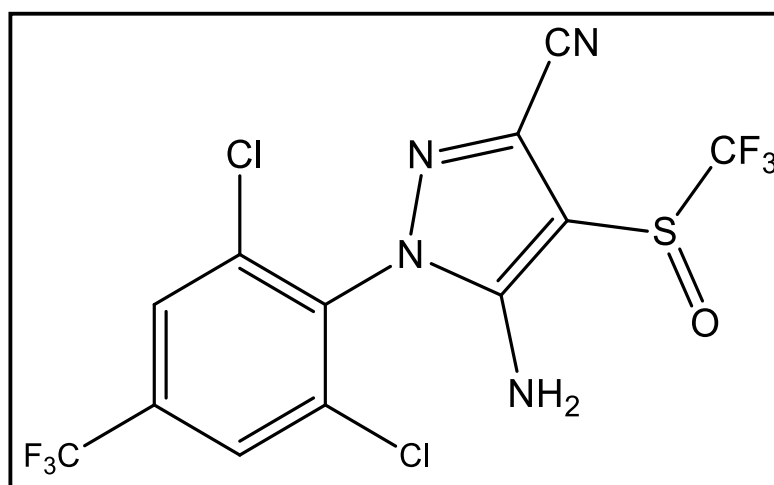


Figura 1. Fórmula estrutural do carrapaticida fipronil (FPN).

Descoberto e desenvolvido por Rhône-Poulenc entre 1985 e 1987 e lançado no mercado em 1993, FPN é altamente eficaz e tem sido comercializado ativamente em uma ampla gama de países industrializados e em desenvolvimento (Tingle *et al.*, 2003). A molécula de FPN age perturbando o sistema nervoso central do inseto, envolvendo ligação não competitiva ao receptor ácido gama-aminobutírico (GABA)

e bloqueando efetivamente os canais de cloro, resultando em paralisia convulsões e morte (Gant *et al.*, 1998).

A contaminação com resíduos de FPN em alimentos, assim como do ambiente, tem sido para a sociedade uma das maiores preocupações quanto a seu uso sistemático (Andreotti, 2010; Brito *et al.*, 2010; Tingle *et al.*, 2000). Recentemente, 15 países da União Européia, Hong Kong e a Suíça foram afetados pela contaminação de ovos por FPN. A principal suspeita é que a substância tenha sido utilizada em granjas para tratar o ácaro roxo, um parasita das aves. A contaminação levou a destruição de cerca de um milhão de ovos (Li *et al.*, 2018; Tu *et al.*, 2019).

Os métodos analíticos desenvolvidos para análise de FPN encontradas na literatura descrevem em maior parte, métodos cromatográficos, envolvendo etapa de preparo de amostra, como demonstrado na Tabela 1

Tabela 1. Métodos analíticos empregados para análise de FPN

Matriz	Extração	Método	LD	LQ	Referência
Solo	Acetona-acetonitrila	GC-MS/ECD	-	0,0001 mg kg ⁻¹	(Bobe <i>et al.</i> , 1998)
	Acetonitrila	GC-MS	9 µg kg ⁻¹	-	(Vílchez <i>et al.</i> , 2001)
	QuEChERS	GC-ECD	0,0003 mg L ⁻¹	0,002 mg kg ⁻¹	(Wang <i>et al.</i> , 2014)
	QuEChERS	UPLC-MS/MS	-	0,005 mg kg ⁻¹	(Wu <i>et al.</i> , 2017)
	QuEChERS	LC-APCI-MS/MS	-	50 µg kg ⁻¹	(Caldas <i>et al.</i> , 2011)
	DCM-acetona (1:1)	RP-HPLC	0,1 µg mL ⁻¹	-	(Hadjmohammadi <i>et al.</i> , 2006)
	Acetonitrila	UPLC-MS/MS	0,5 µg kg ⁻¹	5 µg kg ⁻¹	(Cheng <i>et al.</i> , 2014)
	QuEChERS	LC-MS/MS	0,3 ng g ⁻¹	0,01 mg kg ⁻¹	(Li <i>et al.</i> , 2015)
Água	SPME	GC-MS	-	-	(Vílchez <i>et al.</i> , 2001)
	-	RP-HPLC	0,1 µg mL ⁻¹	-	(Hadjmohammadi <i>et al.</i> , 2006)
	SPE	GC-ECD	-	0,01 µg L ⁻¹	(Marchesan <i>et al.</i> , 2010)
	-	Voltametria	0,80 µg L ⁻¹	2,67 µg L ⁻¹	(Okumura <i>et al.</i> , 2016)
Milho	Acetonitrila	GC-ECD	0,0003 mg L ⁻¹	0,002 mg kg ⁻¹	(Wang <i>et al.</i> , 2014)
	Acetonitrila	LC-MS/MS	1,1 µg kg ⁻¹	5 µg kg ⁻¹	(Cheng <i>et al.</i> , 2014)
Urina humana	SPME	LC-MS/MS	0,07 ng mL ⁻¹	-	(Vílchez <i>et al.</i> , 2001)
Algodão	Acetonitrila	UPLC-MS/MS	-	0,01 mg kg ⁻¹	(Wu <i>et al.</i> , 2017)
Amendoim	QuEChERS	LC-MS/MS	0,3 ng g ⁻¹	0,01 mg kg ⁻¹	(Li <i>et al.</i> , 2015)
Leite de búfala	QuEChERS	CG-MS	0,007 mg kg ⁻¹	0,025 mg kg ⁻¹	(Brondi <i>et al.</i> , 2013)
Carne de búfala	QuEChERS	CG-MS	0,03 mg kg ⁻¹	0,1 mg kg ⁻¹	(Brondi <i>et al.</i> , 2013)
Plasma bovino	SPE	LC-UV	-	5 ng mL ⁻¹	(Cid <i>et al.</i> , 2012)
Quiabo	Acetato de etila	LC-MS/MS	-	1 ng g ⁻¹	(Hingmire <i>et al.</i> , 2015)
Pólen	Solventes orgânicos	GC-ECD/	0,1 µg kg ⁻¹ /	-	(Jiménez <i>et al.</i> , 2007)
		GC-MS	0,07 µg kg ⁻¹		
Plasma de rato	Metanol, acetonitrila, ácido acético	LC/UV/MS/MS	2,5 ng mL ⁻¹ / 50,0 ng mL ⁻¹	-	(Lacroix <i>et al.</i> , 2010)
Ovos	Acetonitrila	LC-MS/MS	-	-	(Zhang <i>et al.</i> , 2016)
Carne de frango	Acetonitrila	LC-MS/MS	-	-	(Zhang <i>et al.</i> , 2016)
Mel		LC-APCI-MS/MS	0,0033 mg kg ⁻¹	0,01 mg kg ⁻¹	(Tomasini <i>et al.</i> , 2012)

Os métodos cromatográficos relatados são métodos convencionais de análise que exigem equipamentos caros e habilidades consideráveis são necessárias para operá-los com sucesso. Além disso, na maioria das vezes estes métodos necessitam de pré-tratamento da amostra e demoradas etapas de extração (El-Desoky *et al.*, 2010).

Os métodos analíticos convencionais geralmente demandam maior tempo de análise, pois são projetados para fornecer informações qualitativas e quantitativas detalhadas sobre analitos na amostra. Neste âmbito, o desenvolvimento de métodos de triagem é de grande importância, pois estes fornecem respostas analíticas acerca

da presença de certo analito em determinada amostra, em menor tempo (Moretti *et al.*, 2016; Toledo *et al.*, 2007).

As técnicas voltamétricas são uma excelente alternativa aos métodos analíticos convencionais, principalmente devido ao menor custo e curto prazo para realizar os ensaios. (Souza, Machado, 2006; Vaz *et al.*, 1996). Destaca-se em particular, a possibilidade de realizar medidas diretas na maioria dos casos, sem necessidade de separação prévia ou etapas de tratamento (Galli *et al.*, 2006; Rupp, Zuman, 2016). Um método analítico para a determinação de fipronil foi desenvolvido em amostras de águas naturais utilizando voltametria de onda quadrada e eletrodo de compósito grafite-poliuretana (GPU) (Okumura *et al.*, 2016).

Neste trabalho, um método inédito, rápido e simples foi desenvolvido e validado, baseado em estudos voltamétricos, com recuperação e limites de detecção satisfatórios para sua aplicação como método de triagem na determinação de FPN em leite.

Material e métodos

Reagentes e solução estoque de FPN

Os reagentes utilizados nesse trabalho foram de pureza grau analítico (P.A) e sem nenhuma etapa prévia de purificação. Fipronil (CAS Number 120068-37-3) foi obtido da Sigma-Aldrich (Fluka, USA) como um padrão analítico. Devido à baixa solubilidade de FPN em água, a solução estoque foi preparada em solução alcoólica contendo 2,000 g L⁻¹ ou 4,575 mmol L⁻¹. A solução estoque de FPN e todas as outras soluções necessárias para composição do eletrólito de suporte foram mantidas sob-refrigeração (abaixo de 10 °C). As soluções de trabalho foram sempre preparadas no dia de cada análise, pela transferência quantitativa de alíquotas da solução estoque para uma célula voltamétrica convencional e posterior diluição para um volume final de 10,00 mL, utilizando-se como eletrólito de suporte uma solução de NaOH 0,100 mol L⁻¹ preparada em solução etanol-água 30% (v/v).

A água utilizada no preparo de todas as soluções e na construção das curvas analíticas foi purificada em sistema Milli-Q System, Millipore (resistividade de 18,2 MΩ cm⁻¹) (USA). Hidróxido de potássio, hidróxido de sódio, ácido bórico (99,5%), ácido acético (99,7%), ácido fosfórico (85%), perclorato de sódio, fosfato de sódio

monobásico e fosfato de sódio bibásico foram adquiridos da Vetec e etanol (~96 %) adquirido da Fluka.

Amostras de leite

Para desenvolvimento e validação do método foram utilizadas amostras de leite UHT desnatado, zero lactose adquiridos no comércio de Viçosa (MG, Brasil), nos quais não foram detectados a presença do analito. A amostra foi mantida em geladeira até o momento de ser utilizada.

Instrumentação

A instrumentação empregada para a realização do experimento consistiu de um potenciostato/galvanostato PGSTAT 128 N Autolab potentiostat (Eco-Chemie, Utrecht, The Netherlands) interfaciado a um computador pelo software GPES (versão 4.9). Foi utilizada uma célula eletroquímica convencional de 50,00 mL equipada com arranjo de três eletrodos, um eletrodo de referência Ag|AgCl, KCl_{sat.} 3,0 mol L⁻¹, um eletrodo auxiliar de platina e um eletrodo para compactação de pasta de carbono (CPE) como eletrodo de trabalho de área geométrica superficial igual a 0,283 cm². Todos os eletrodos foram adquiridos da Metrohm® (Switzerland).

A pasta de carbono foi preparada pela mistura de grafite em pó (Merck®) e óleo mineral (Acros Organic®) em proporções adequadas. A mistura resultante de cada proporção foi dispersa em hexano (Sigma-Aldrich®) e agitada por aproximadamente uma hora em agitador magnético (CORNING, PC-420D) até a evaporação completa do solvente. Posteriormente, a pasta de carbono preparada foi seca em temperatura ambiente. Para realização das medidas voltamétricas a pasta de carbono foi inserida no eletrodo, evitando-se a formação de espaços vazios no seu interior e de forma a obter-se uma superfície homogênea.

Após cada medida voltamétrica foi realizada a renovação da superfície eletródica retirando-se uma camada superficial de pasta do eletrodo, empacotando-se novamente uma pequena quantidade de pasta de carbono.

Avaliação do comportamento voltamétrico de FPN

Primeiramente foi realizada uma investigação sobre a eletroatividade de FPN 0,400 mmol L⁻¹ em solução de NaOH 0,100 mol L⁻¹ preparada em solução etanol-água 30% (v/v) e eletrodo de pasta de carbono (CPE). Para isso empregou-se a

técnica de voltametria cíclica na qual foram examinadas diferentes faixas de potencial nos sentidos anódico e catódico.

A fim de avaliar os critérios de diagnóstico para o comportamento voltamétrico do analito, foram realizados alguns ensaios por voltametria cíclica a partir da variação da taxa de varredura (v). Todos os ensaios foram realizados a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) e em triplicata.

Otimização das condições de análise para FPN

Uma solução de $0,400 \text{ mmol L}^{-1}$ de FPN foi preparada em solução de NaOH $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ de etanol-água 30% (v/v) para teste por VC, utilizando CPE dentro do intervalo do potencial positivo (E_{pa}) de $-0,100 \text{ V} < E_{pa} < +1,1 \text{ V vs. Ag|AgCl, KCl}_{sat.} 3,0 \text{ mol L}^{-1}$. Oito soluções de eletrólito de suporte em diferentes valores de pH foram testadas por VC, a fim de se estabelecer em qual solução o analito proporcionaria a maior intensidade de corrente de pico anódico (I_{pa}) e menor valor de potencial de pico anódico (E_{pa}).

Foram testados os eletrodos de carbono vítreo, platina, ouro, grafite pirolítico e CPE (composto por pó de grafite/óleo mineral na proporção 70:30 (%m/m), com áreas geométricas iguais a $0,127 \text{ cm}^2$; $0,031 \text{ cm}^2$; $0,196 \text{ cm}^2$; $0,196 \text{ cm}^2$ e $0,283 \text{ cm}^2$, respectivamente. Primeiramente os cinco eletrodos foram devidamente ativados. A ativação do eletrodo de grafite pirolítico consistiu em realizar uma varredura pela técnica de voltametria de pulso diferencial no intervalo de (E_{pa}) $-0,2 \text{ V} < E_{pa} < +1,5 \text{ V vs. Ag|AgCl, KCl}_{sat.} 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ em NaOH $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ sob agitação, fixando o potencial $+1,5 \text{ s}$ por 120 s . Os eletrodos de ouro e de platina foram ativados com 10 varreduras sucessivas em voltametria cíclica em HCl $0,100 \text{ mol L}^{-1}$, sendo que os intervalos de E_{pa} para o eletrodo de ouro consistiram entre (E_{pa}) de $0,0 \text{ V} < E_{pa} < +1,4 \text{ V vs. Ag | AgCl, KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ e para o eletrodo de platina entre (E_{pa}) de $-0,2 \text{ V} < E_{pa} < +1,5 \text{ V vs. Ag|AgCl, KCl}_{sat.} 3,0 \text{ mol L}^{-1}$. Após ativação, os eletrodos foram testados em triplicata por VC com FPN $0,400 \text{ mmol L}^{-1}$ e então foram calculadas separadamente as médias e os desvios padrão das densidades de corrente para cada um dos eletrodos.

A fim de obter maior sensibilidade e seletividade nas análises voltamétricas quantitativas, realizou-se um estudo de otimização de parâmetros instrumentais para as técnicas de voltametria de pulso diferencial (DPV) e voltametria de onda quadrada (SWV). Todas as medidas foram realizadas utilizando testes univariados em uma

solução de 0,400 mmol L⁻¹ de FPN preparada em solução de NaOH 0,100 mol L⁻¹ de etanol-água 30% (v/v) e eletrodo de pasta de carbono (CPE).

Em ambas as técnicas, três parâmetros foram examinados e os critérios definidos para escolha da técnica foram: maior intensidade de corrente de pico, menores desvios de I_{pa} entre as repetições e menores valores de W_{1/2}.

Validação do método e aplicação em amostras de leite UHT desnatado, zero lactose

Após otimização dos parâmetros voltamétricos do eletrólito de suporte e do eletrodo de trabalho, duas curvas analíticas foram construídas, na ausência e na presença de leite UHT desnatado, zero lactose, pela adição de alíquotas da solução estoque de FPN em concentrações finais variando entre 2,00 mg L⁻¹ e 16,00 mg L⁻¹ na célula contendo o eletrólito de suporte. Foram aplicadas regressões lineares para cada curva pelo método de mínimos quadrados e todos os ensaios foram realizados a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) e pelo menos em triplicata.

O efeito de matriz foi avaliado estatisticamente aplicando o teste *t-student* a 95% de confiança (Meier & Zünd 2000), utilizando a equação apresentada:

$$t_{calc} = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{s(a_1)^2 + s(a_2)^2}} \quad (1)$$

Onde a_1 e a_2 são as inclinações das curvas analíticas na ausência e presença de matriz leite UHT desnatado, zero lactose, respectivamente. $s(a_1)$ e $s(a_2)$ são estimativas de desvio padrão da inclinação. O valor t calculado foi comparado com o valor de t crítico determinado em uma tabela de *t-student* a 95% de confiança, respeitando o grau de liberdade da análise.

A fim de assegurar a confiabilidade dos resultados do método desenvolvido, foram determinadas algumas figuras de mérito. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir das equações 1 e 2, respectivamente:

Os valores de LD e LQ para RNZ foram calculados com as Equações 1 e 2, a partir do desvio padrão absoluto da corrente elétrica (S_b), medidas exatamente na E_{pc} do analito após 12 varreduras realizadas no branco, e a inclinação (b) da curva analítica. (MAPA, 2011; Ribani *et al.*, 2004)

$$LD = \frac{3.S_b}{b} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{10.S_b}{b} \quad (2)$$

Em que S_b é o desvio padrão absoluto da corrente elétrica medidas exatamente no E_{pc} do analito após 12 varreduras realizadas no branco e b corresponde às inclinações das curvas analíticas construídas na ausência e presença de matriz.

Também foram avaliados a linearidade, precisão, exatidão e seletividade do método conforme recomendação de agências regulatórias brasileiras (ANVISA, 2003; INMETRO, 2010; MAPA, 2011), da literatura (Paschoal *et al.*, 2008; Ribani *et al.*, 2004) e a IUPAC 1978.

Resultados e discussão

Comportamento voltamétrico de FPN

Os estudos preliminares se objetivaram em caracterizar os possíveis processos de oxirredução de FPN $0,400 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução de NaOH $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ preparada em solução etanol-água 30% (v/v) por voltametria cíclica (VC), utilizando CPE como eletrodo de trabalho composto por pó de grafite/óleo mineral na proporção 70:30 (%m/m). Diferentes faixas de potencial nos sentidos anódico e catódico foram examinadas. Foi observado um pico em $+0,734 \text{ V vs. Ag | AgCl, KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ (E_{pa}) em uma taxa de varredura de 100 mV s^{-1} dentro do intervalo de potencial positivo (E_{pa}) de $-0,100 \text{ V} < E_{pa} < +1,1 \text{ V vs. Ag|AgCl, KCl}_{\text{sat.}} 3,0 \text{ mol L}^{-1}$, que foi atribuído como o pico de oxidação do carrapaticida, representado na Figura 2A. A ausência de pico catódico durante a varredura inversa sugere a ocorrência de um processo de oxidação irreversível ou a existência de reações químicas acopladas na sequência do processo eletródico.

O ensaio seguinte foi realizado aplicando varreduras sucessivas em VC sem a renovação da superfície do eletrodo de trabalho. Conforme apresentado na Figura 2B houve uma diminuição gradativa da intensidade da corrente de pico anódico (I_{pa}) após cada ciclo (aproximadamente 80% entre o primeiro e o décimo ciclo). Esse fenômeno ocorre devido à possível adsorção de FPN ou seu produto de oxidação na

superfície do eletrodo de trabalho, então a renovação da superfície do CPE foi realizada manualmente antes de cada medida voltamétrica.

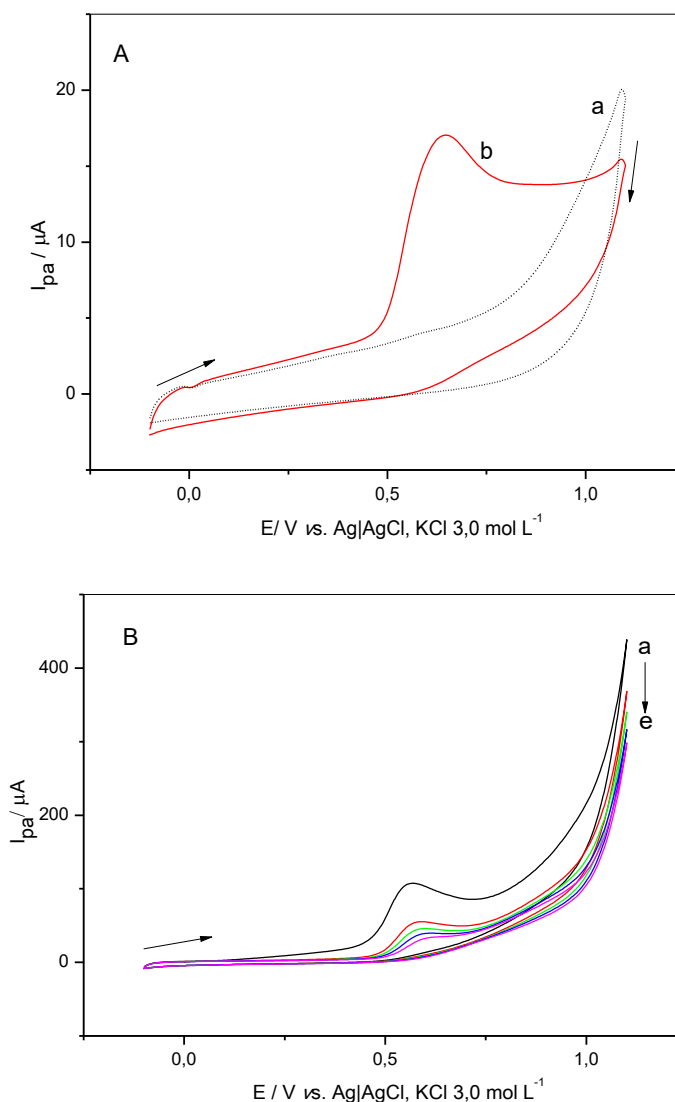


Figura 2. (A) Voltamogramas cíclicos do (a -) branco e (b -) solução FPN 0,400 mmol L⁻¹ em solução de NaOH 0,100 mol L⁻¹ preparada em etanol-água 30% (v/v). (B) Voltamogramas em ciclos sucessivos: (a -) 1º ciclo; (b -) 2º ciclo; (c -) 3º ciclo; (d -) 5º ciclo; (e -) 10º ciclo. ($v = 100 \text{ mV s}^{-1}$).

Com o intuito de avaliar o grau de reversibilidade e a natureza do transporte do material eletroativo para a superfície do eletrodo, foi realizado o experimento de variação de velocidade de varredura (v) de VC entre 25-300 mV s^{-1} em um intervalo de potencial (E_{pa}) de $-0,100 \text{ V} < E_{pa} < +1,1 \text{ V vs. Ag | AgCl, KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando-se uma solução de NaOH 0,100 mol L⁻¹ preparada em solução etanol-água 30% (v/v) como eletrólito de suporte.

A corrente de pico anódico (I_{pa}) variou linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ($v^{1/2}$) (Figura 3A), indicando que o principal mecanismo de transferência de massa para a redução do composto orgânico é a difusão no interior da solução para a superfície do eletrodo de trabalho (Bard, Faulkner 2001). Com o intuito de confirmar a irreversibilidade do processo de oxidação do FPN determinou-se a relação entre a função corrente ($I_{pa} / v^{1/2}$) e diferentes velocidades de varredura (v).

Observa-se na Figura 3B que os valores de ($I_{pa} / v^{1/2}$) são praticamente independentes de v , que confirma que a transferência eletrônica no processo anódico é irreversível e sem a existência de qualquer reação química acoplada ao sistema redox (Nicholson, Shain, 1964).

A Figura 3C apresenta a relação linear obtida entre ($\log I_{pa}$ vs. $\log v$) com inclinação da reta $\sim 0,5$ indicando assim um processo de transferência de massa controlado majoritariamente por difusão (Bard, Faulkner 2001) reafirmando a indicação obtida pela relação linear entre I_{pa} e $v^{1/2}$. Apesar disso, o coeficiente linear diferente de zero indica, mesmo que de forma secundária, a existência de um processo de adsorção na superfície do eletrodo de trabalho.

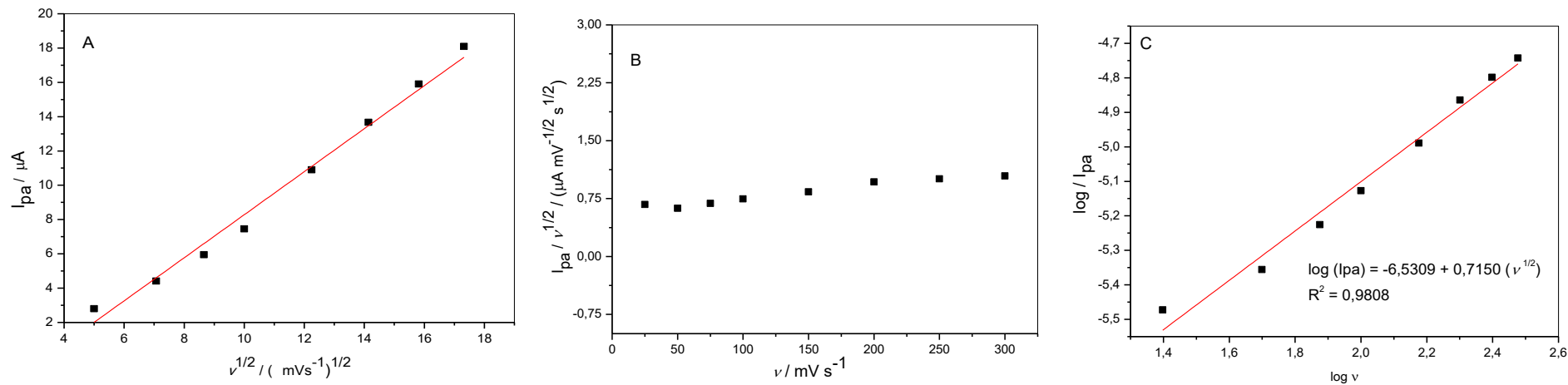


Figura 3. (A) Intensidade da corrente de pico catódico (I_{pa}) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$); (B) Dependência da função corrente ($I_{pa} / v^{1/2}$) com a velocidade de varredura de potencial; (C) Variação do logaritmo de I_{pa} em função do logaritmo da velocidade de varredura em VC para uma solução de FPN $0,400 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução de NaOH $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ preparada em etanol-água 30% (v/v) utilizando eletrodo de pasta de carbono (CPE).

O número de elétrons transferidos no processo redox de FPN na superfície do eletrodo de trabalho foi determinado a partir de dados experimentais obtidos por DPV e empregando a equação 1 (Brett & Brett 1993):

$$W_{1/2} = \frac{3,52 R T}{n F} \quad (1)$$

Em que $W_{1/2}$ é a largura do pico redox a meia altura, R é a constante de gás ideal ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T é a temperatura absoluta e, graus Kelvin (298 K), n é o número de elétrons e F é a constante de Faraday ($96,485 \text{ C mol}^{-1}$). Calculou-se $n = 0,9$, o que sugere que apenas um elétron é transferido do composto para a superfície do eletrodo de trabalho durante a oxidação de FPN.

Ajuste do eletrólito de suporte

O primeiro parâmetro a ser estabelecido foi a solução de eletrólito de suporte em que o analito proporcionaria melhor resposta voltamétrica por VC. A baixa solubilidade de FPN em etanol em valores de pH abaixo de 6,0 impossibilitou a observação do seu comportamento eletrodico em soluções neutras ou ácidas. Então, realizou-se o estudo com soluções de tampão Britton-Robinson (BR) $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ em valores de pH de 6,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0; tampão fosfato $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 12,0; NaOH $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 13,1 e KOH $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 13,3. A Figura 4A mostra as varreduras cíclicas de FPN $0,400 \text{ mmol L}^{-1}$ nas oito soluções aquosas de eletrólitos de suporte. Como observado, a solução aquosa de NaOH $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ preparada em solução etanol-água 30% (v/v) apresentou pequeno aumento na intensidade de corrente de pico (I_{pa}) em relação a KOH $0,100 \text{ mol L}^{-1}$.

É importante ressaltar o efeito de eletrocatalise que ocorre ao comparar as soluções de eletrólitos de suporte. Entre a solução testada de menor pH que apresentou pico anódico para FPN (tampão BR $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,00) e NaOH $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ pH 13,1 ocorre diminuição acentuada de E_{pa} , cerca de 35,18% (Figura 4B). O deslocamento de E_{pa} para valores menos positivos possui grande importância, pois está intimamente relacionado à diminuição de energia gasta na reação de oxidação do composto, além de contribuir para o aumento da seletividade do método.

Dessa forma, foi escolhida a solução aquosa de NaOH 0,100 mol L⁻¹ preparada em solução etanol-água 30% (v/v) para o desenvolvimento do método eletroanalítico.

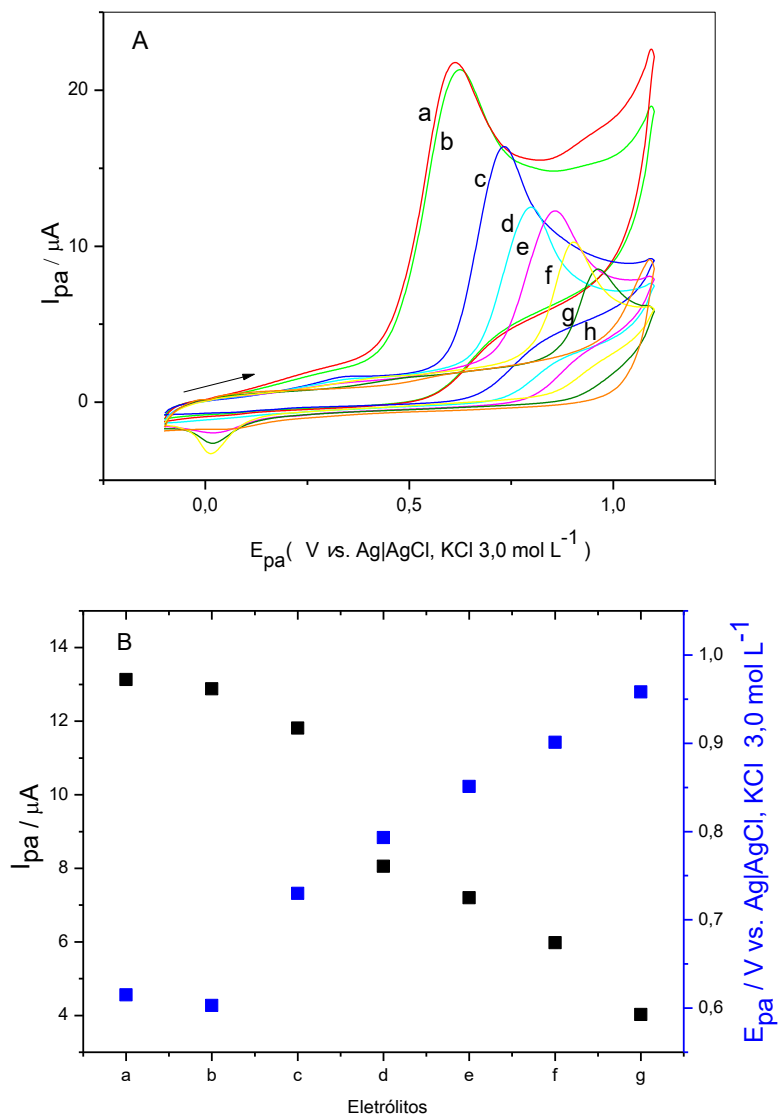


Figura 4. A) Voltamogramas cíclicos de solução aquosa de FPN 0,400 mmol L⁻¹ com CPE usando (a -) NaOH 0,100 mol L⁻¹; (b -) KOH 0,100 mol L⁻¹; (c -) tampão fosfato 0,100 mol L⁻¹ em pH 12,0; (d -) tampão BR em pH 11,00 (e -) tampão BR em pH 10,00; (f -) tampão BR em pH 9,00; (g -) tampão BR em pH 8,00 e (h -) tampão BR em pH 6,00 como eletrólitos de suporte. B) Variação de I_{pa} e E_{pa} entre os eletrólitos: (a) NaOH 0,100 mol L⁻¹; (b) KOH 0,100 mol L⁻¹; (c) tampão fosfato 0,100 mol L⁻¹ em pH 12,0; (d) tampão BR em pH 11,00 (e) tampão BR em pH 10,00; (f) tampão BR em pH 9,00; (g) tampão BR em pH 8,00.

Embora fosse esperado uma maior solubilidade de FPN em meio ácido devido a protonação do grupo funcional amina, o que se observou foi o aumento da solubilidade dessa estrutura com o aumento do valor do pH. A baixa basicidade da amina pode ser facilmente entendida pelo fato do par de elétrons livres do nitrogênio não estar disponível para um ataque nucleofílico a um íon hidrônio. Este fato se deve a este estar conjugado com as duplas ligações presentes na estrutura o que o torna deslocalizado sob a superfície da molécula.

Por outro lado, a presença do grupo $-\text{SO}(\text{CF}_3)$ na molécula, pode, em condições básicas, atribuir carga negativa à estrutura do FPN levando a sua solubilização em meio aquoso. Isto se deve ao caráter retirador de elétrons do grupo $-\text{CF}_3$ que torna o enxofre fortemente eletrofílico (Figura 6A – seta em vermelho indicando o efeito indutivo retirador de elétrons do grupo $-\text{CF}_3$). Isto possibilita o ataque de algum nucleófilo presente no meio reacional (OH^- , H_2BO_3^- , HBO_3^{2-}) ao enxofre levando à deslocalização do par de elétrons da dupla ligação S-O sob o átomo de oxigênio (Figura 5A).

Por meio do cálculo do número de elétrons transferidos (um elétron) é possível afirmar que a espécie que é produzida pelo processo de oxidação é uma estrutura que apresenta um elétron desemparelhado sendo que este, devido às duplas ligações conjugadas, está deslocalizado sob toda a molécula (Figura 5C).

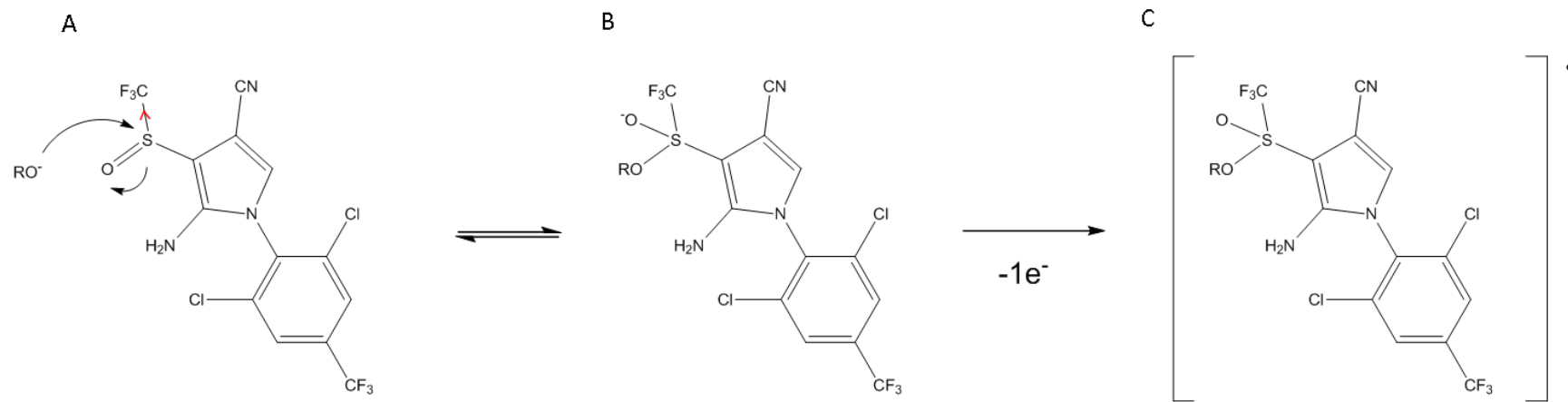


Figura 5. Proposta de mecanismo para a baixa solubilidade em valores de pH menor que 6,0 e para a oxidação de FPN em CPE.

Ajuste do eletrodo de trabalho e composição da pasta de carbono

O seguinte parâmetro avaliado foi a escolha do eletrodo de trabalho a ser utilizado no desenvolvimento do método. Observa-se na Figura 6A, que o CPE apresentou maior densidade de I_{pa} (cerca de 139,0%) e menor desvio padrão entre as medidas quando comparado aos eletrodos de grafite pirolítico e carbono vítreo, conseqüentemente este foi o eletrodo de trabalho escolhido para o desenvolvimento do método. Os eletrodos de ouro e platina não apresentaram picos para FPN 0,400 mmol L⁻¹.

A melhor composição da pasta de carbono também foi avaliada entre oito proporções diferentes incluindo pó de grafite, óleo mineral, grafeno, líquido iônico e nanotubos de carbono. Como pode ser visto na Figura 6B, a pasta composta por pó de grafite/óleo mineral na proporção 70: 30 (%m/m) apresentou menor $W_{1/2}$ e E_{pa} além de apresentar maior intensidade de I_{pa} , sendo a composição escolhida para a execução do trabalho.

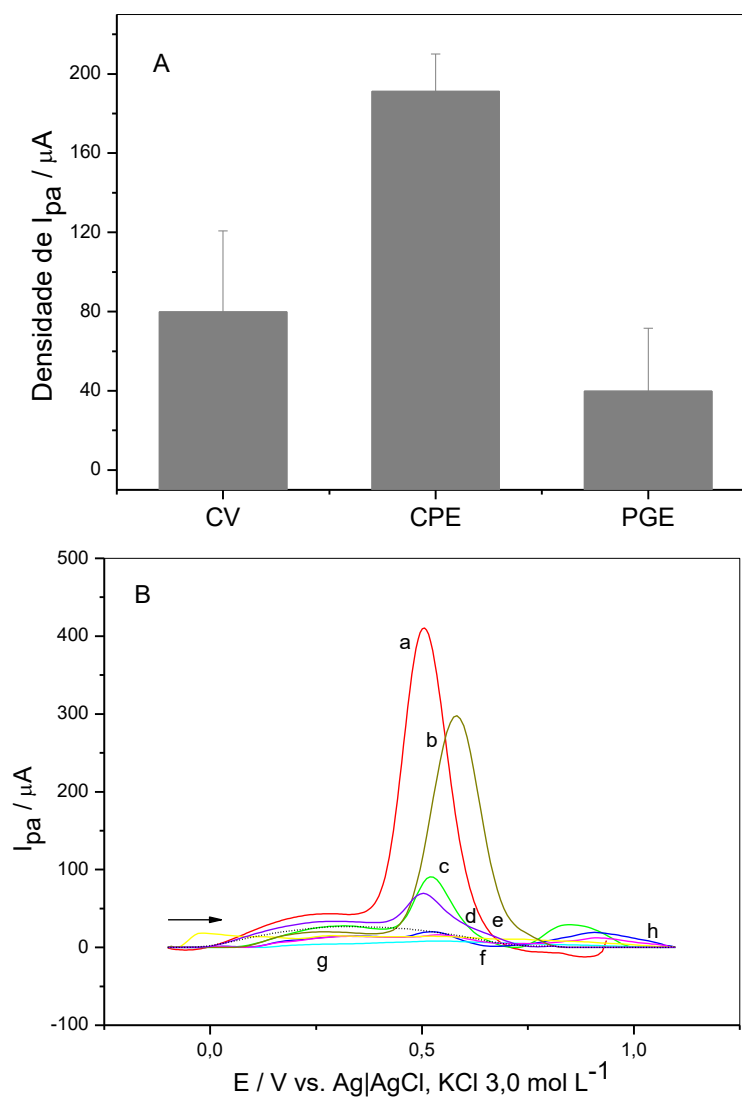


Figura 6. (A) Médias e desvios padrão dos valores de I_{pa} para FPN $0,400 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução de NaOH $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ preparada em solução etanol-água 30% (v/v) por voltametria cíclica com os eletrodos de carbono vítreo (CV), pasta de carbono (CPE) e de grafite pirolítico (PGE). (B) Modificações do eletrodo e pasta de carbono (a -) pó de grafite/óleo mineral na proporção 70:30 (%m/m); (b -) pó de grafite/óleo mineral na proporção 75:25 (%m/m); (c -) pó de grafite/óleo mineral/líquido iônico na proporção 70:20:10 (%m/m); (d -) pó de grafite/óleo mineral na proporção 80:20 (%m/m); (e -) pó de grafite/óleo mineral /líquido iônico na proporção 70:15:15 (%m/m); (f -) pó de grafite/óleo mineral na proporção 70:15:15 (%m/m); (g -) pó de grafite/óleo mineral/grafeno na proporção 70:10:20 (%m/m) e (h -) pó de grafite/óleo mineral/nanotubos de carbono/líquido iônico na proporção 65:5:15:15 (%m/m).

Otimização instrumental para DPV e SWV

As técnicas de DPV e SWV fornecem correntes mais intensas e picos mais definidos que as técnicas voltamétricas cíclicas e lineares, devido à diminuição da corrente capacitiva medida pelas técnicas de pulso, o que possibilita a aplicação das mesmas em análises quantitativas. Dessa maneira, um estudo de otimização de parâmetros instrumentais de análise para as duas técnicas foi realizado. Para escolha das condições instrumentais de análise, os maiores valores de I_{pa} juntamente com os menores valores de largura de pico a meia altura e desvio entre medidas foram os parâmetros considerados ideais para as análises seguintes. Nas Figuras 7A, 7B e 7C observam-se os resultados obtidos em DPV para a variação de I_{pc} e $W_{1/2}$ em função da variação da velocidade de varredura, da amplitude de pulso, e do tempo de pulso, respectivamente.

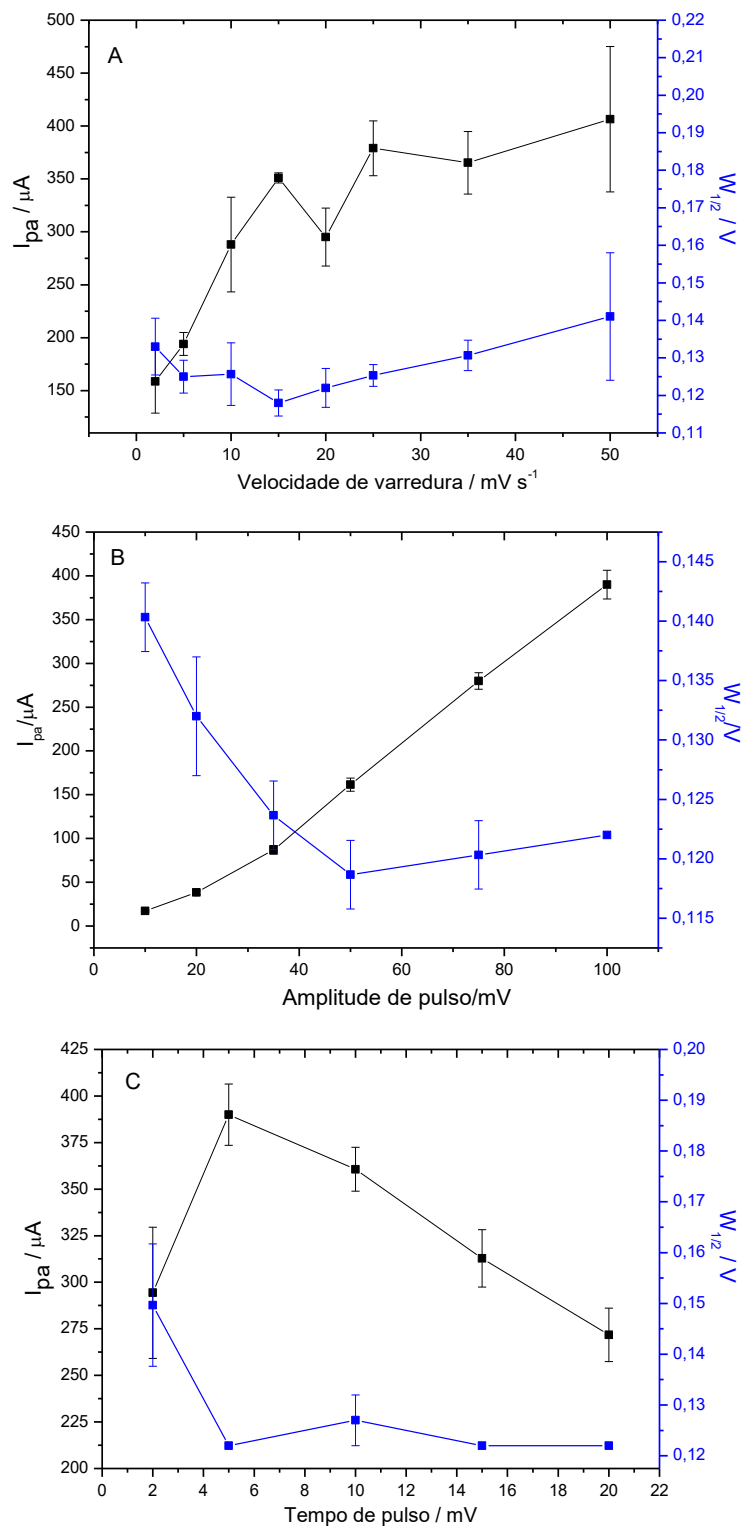


Figura 7. Variação de I_{pa} e largura de pico a meia altura ($W_{1/2}$) em função de (A) velocidade de varredura, (B) amplitude de pulso e (C) tempo de pulso por DPV para uma solução de $0,400 \text{ mmol L}^{-1}$ de FPN preparada em solução de NaOH $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ etanol-água 30% (v/v).

Nas Figuras 8A, 8B e 8C são mostrados os resultados obtidos para I_{pa} e $W_{1/2}$ para análises de RNZ em função da variação de frequência, amplitude de pulso e incremento de varredura na SWV.

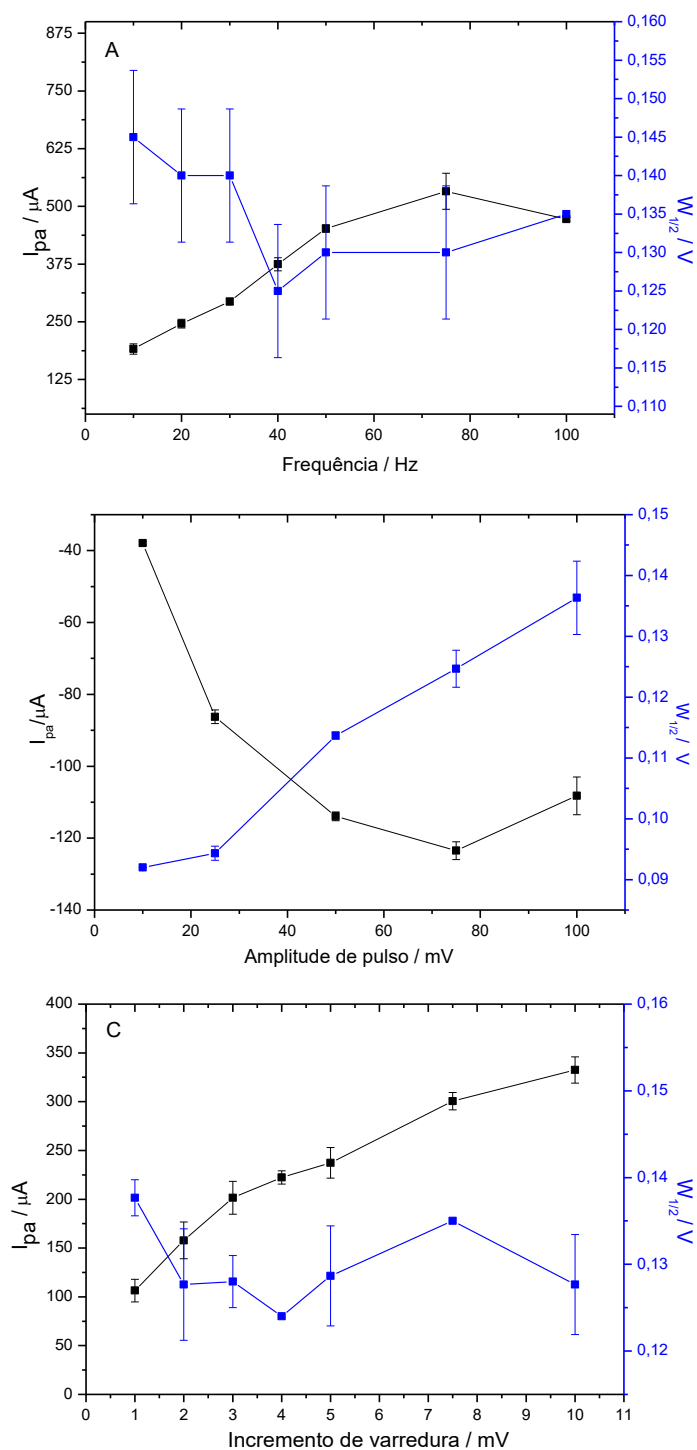


Figura 8. Variação de I_{pa} e largura de pico a meia altura ($W_{1/2}$) em função de (A) frequência de varredura, (B) amplitude de pulso e (C) incremento de varredura por SWV para solução de para FPN 0,400 mmol L⁻¹ em solução de NaOH 0,100 mol L⁻¹ preparada em solução etanol-água 30% (v/v).

O intervalo de avaliação e o melhor valor escolhido para cada parâmetro das duas técnicas voltamétricas são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros voltamétricos de DPV e SWV ajustados para análise de FP

DPV		
Parâmetro	Faixa de avaliação	Valor escolhido
Velocidade de varredura (mV s ⁻¹)	2 – 50	25
Amplitude de pulso (mV)	10 – 100	100
Tempo de pulso (ms)	2 – 20	5
SWV		
Parâmetro	Faixa de avaliação	Valor escolhido
Amplitude de pulso (mV)	10 – 100	50
Frequência de pulso (Hz)	10 – 100	100
Incremento de varredura (mV)	1 – 10	10

Após otimização dos parâmetros, as técnicas de SWV e DPV foram comparadas em uma mesma solução aquosa FPN 0,400 mmol L⁻¹ em solução de NaOH 0,100 mol L⁻¹ preparada em solução etanol-água 30% (v/v) como eletrólito de suporte conforme apresentado na Figura 9. Como pode ser observado, a DPV se mostrou a técnica mais adequada, pois, além de apresentar aumento significativo (cerca de 13%) de I_{pa}, a técnica DPV também apresentou menores valores de E_{pa} e W_{1/2} comparada à técnica SWV, levando a maior sensibilidade e seletividade do método desenvolvido.

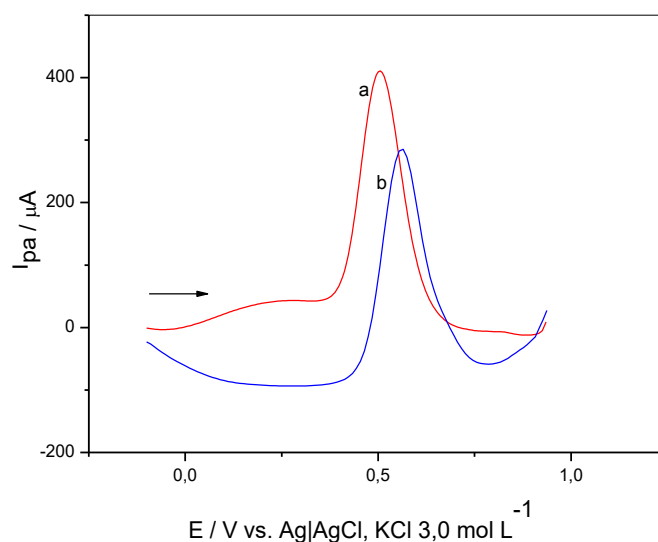


Figura 9. Voltamogramas obtidos sob as melhores condições em (a –) DPV e (b –) SWV para uma solução de FPN $0,400 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução de NaOH $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ preparada em solução etanol-água 30% (v/v).

Determinação de FPN em leite UHT desnatado, zero lactose e validação do método

Como já mencionado, a DPV se apresentou como a técnica mais apropriada do que a SWV para determinação de FPN em leite UHT desnatado, zero lactose, devido à maior seletividade, sensibilidade e repetitividade, além de fornecer um pico anódico mais definido em $E_{pa} = +0,734 \text{ V vs. Ag|AgCl, KCl}_{\text{sat.}} 3,0 \text{ mol L}^{-1}$. FPN foi determinado por DPV (com concentrações variando entre $2,00 \text{ mg L}^{-1}$ e $16,00 \text{ mg L}^{-1}$) com parâmetros otimizados, visando uma melhor reprodutibilidade eletroquímica.

Curvas analíticas

Duas curvas analíticas foram construídas pelo método de mínimos quadrados, a partir do ajuste linear da relação entre os valores de I_{pa} versus concentração de FPN usando o método eletroanalítico desenvolvido. Na primeira curva foram utilizados dados de DPV para FPN na ausência de leite, ou seja, empregando apenas a solução padrão e eletrólito de suporte (Figura 10A).

Para a construção da segunda curva analítica foram utilizados os dados de DPV para FPN na presença da matriz leite e seu efeito na resposta eletroquímica do analito (Figura 10B). Dentro da faixa de concentração examinada ($2,00 \text{ mg L}^{-1}$ e

16,00 mg L⁻¹), foram obtidas respostas lineares ($r^2 > 0,99$), conforme indicado na Tabela 3.

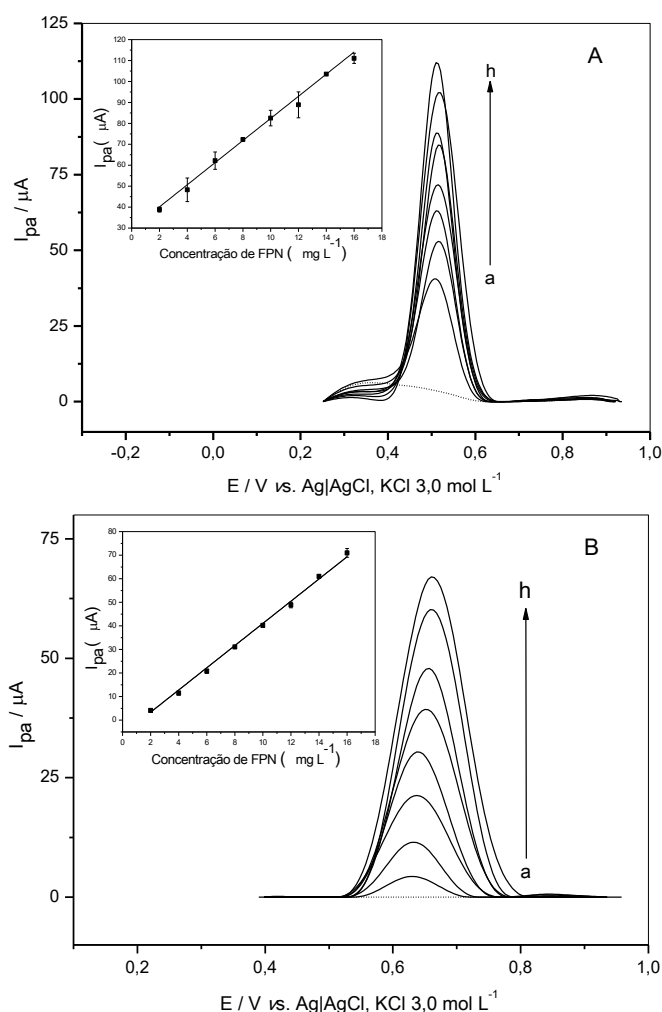


Figura 10. Curvas analíticas na (A) ausência e (B) presença de matriz e efeitos da concentração de analito na relação entre I_{pa} e E_{pa} : (a) 2,0 mg L⁻¹; (b) 4,0 mg L⁻¹; (c) 6,0 mg L⁻¹; (d) 8,0 mg L⁻¹; (e) 10,0 mg L⁻¹; (f) 12,0 mg L⁻¹; (g) 14,0 mg L⁻¹ e (h) 16,0 mg L⁻¹ mg L⁻¹. Condições: CPE com NaOH 0,100 mol L⁻¹ preparada em solução etanol-água 30% (v/v) como eletrólito de suporte

Tabela 3. Equações das curvas analíticas para determinação quantitativa de FPN na ausência e presença de matriz leite

Matriz	Equação da reta $y = a + bx$	Coefficiente de determinação (r^2)
Ausência	$(I_{pa} / \mu A) = 2,95 \cdot 10^{-5} + 5,28 \cdot 10^{-6} [C / (mg L^{-1})]$	0,998
Leite	$(I_{pa} / \mu A) = -6,04 \cdot 10^{-6} + 4,71 \cdot 10^{-6} [C / (mg L^{-1})]$	0,997

Quando o ajuste de dados analíticos é linear, como neste trabalho, a sensibilidade é constante dentro desta faixa de trabalho avaliada e pode ser determinada pela inclinação b da curva analítica. (MAPA, 2011) Nota-se que a sensibilidade é reduzida na presença de matriz, conforme observado pelos resultados na Tabela 3 e na Figura 11.

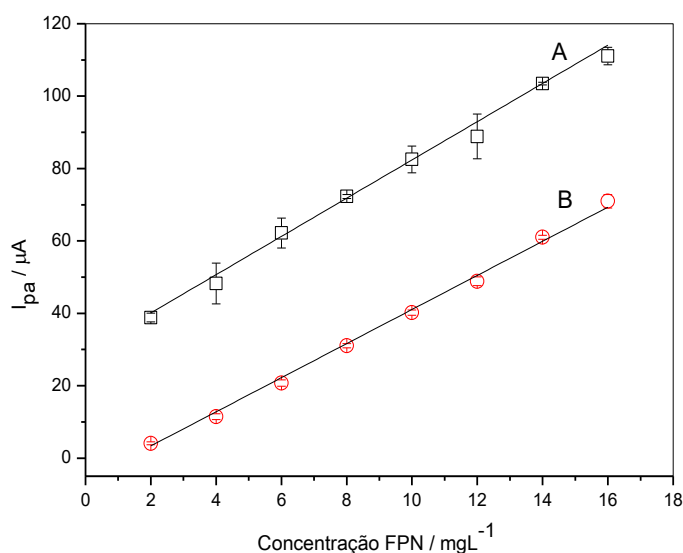


Figura 11. Comparação entre curvas analíticas obtidas na (A –) ausência de matriz e (B –) em leite.

A fim de verificar a interferência da matriz na resposta eletroquímica de RNZ, foi feita a comparação entre as inclinações das curvas analíticas obtidas na ausência e presença de matriz. O efeito de matriz foi avaliado, estatisticamente, pelo teste *t-student* a 95% de confiança (Meier & Zünd 2000). O valor t calculado (5,19) se apresentou maior que o valor t crítico (2,17) ($p < 0,05$) o que confirma a existência de efeito de matriz. Pode-se então inferir que a matriz afeta negativamente a sensibilidade do método desenvolvido para determinação de RNZ.

Uma vez que um efeito de matriz está envolvido na análise deste composto, o método de adição de padrão deve ser aplicado.

Limites de detecção e quantificação

Os valores de LD e LQ para FPN foram calculados com as Equações 1 e 2, como funções do desvio padrão absoluto da corrente elétrica (S_b), medidas exatamente no E_{pa} do analito após 12 varreduras realizadas no branco, e a inclinação (b) da curva analítica. (MAPA, 2011; Ribani *et al.*, 2004)

$$LD = \frac{3.S_b}{b} \quad (2)$$

$$LQ = \frac{10.S_b}{b} \quad (3)$$

Tabela 4. Limites de detecção e quantificação para análise de FPN na ausência e presença de matriz leite

Matriz	b	S _b	LD	
			(mg L ⁻¹)	(mmol L ⁻¹)
Ausência	5,28x10 ⁻⁶	9,99x10 ⁻⁷	0,568	1,29
Leite	4,71x10 ⁻⁶	5,20x10 ⁻⁷	0,331	0,759
Matriz	b	S _b	LQ	
			(mg L ⁻¹)	(mmol L ⁻¹)
Ausência	5,28x10 ⁻⁶	9,99x10 ⁻⁷	1,89	4,32
Leite	4,71x10 ⁻⁶	5,20x10 ⁻⁷	1,10	2,53

Mesmo se apresentando acima do LMR (20,0 µg L⁻¹) para FPN em leite, os valores de LD e LQ se mostram satisfatórios para o método voltamétrico desenvolvido, uma vez que este método de triagem além de se apresentar rápido e simples tem como principal objetivo o fornecimento de informações preliminares acerca da presença de FPN em amostras de leite, antecedendo análises quantitativas mais detalhadas.

Linearidade

A avaliação da linearidade foi realizada pela análise do coeficiente de determinação e da análise dos gráficos dos resíduos. Como demonstrado na Tabela 3, as curvas analíticas construídas na ausência e presença de matriz leite UHT desnatado, zero lactose para análise de FPN mostraram coeficientes de determinação maiores que 0,990, como recomendado (ANVISA, 2003), caracterizando o bom ajuste dos dados experimentais, e linearidade do método proposto.

A Figura 13 representa os gráficos de resíduos referentes ao ajuste linear de I_{pa} vs. C_{FPN}, na ausência (Figura 12A) e na presença (Figura 12B) da matriz.

Observa-se que os resíduos parecem distribuir-se aleatoriamente ao redor de zero, com dispersão simétrica e aleatória das respostas instrumentais, indicando um ajuste satisfatório (MAPA, 2011; Paschoal *et al.*, 2008).

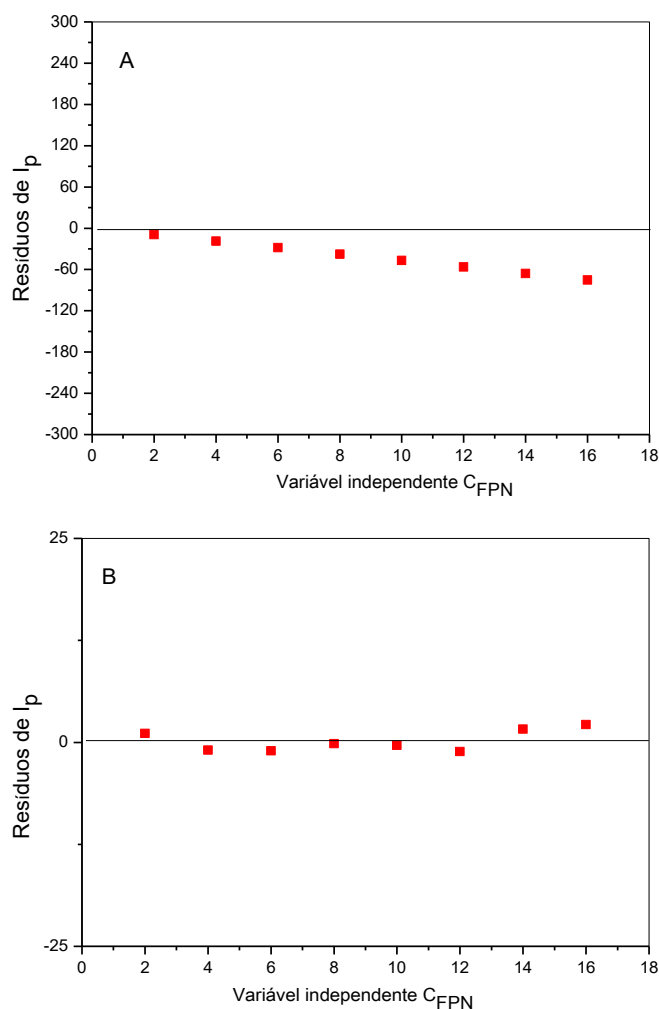


Figura 12. Gráfico de resíduos do ajuste das respostas instrumentais I_{pa} , em função da concentração para a curva analítica construída para quantificar FPN na ausência (A) e presença de matriz (B).

Precisão

A precisão do método foi avaliada por meio da repetitividade (precisão intra-dia) e da precisão intermediária (precisão inter-dia) utilizando soluções de eletrólito de suporte preparadas em leite UHT desnatado, zero lactose e adições simultâneas do carrapaticida FPN em três níveis de concentrações da faixa linear (4,00 mg L⁻¹; 10,00 mg L⁻¹ e 16,00 mg L⁻¹). Avaliou-se a repetitividade pela realização de dez análises sucessivas em um único dia, e a precisão intermediária foi determinada a partir de

cinco medidas com diferentes soluções realizadas em dias distintos. Estes valores foram expressos pelo coeficiente de variação (CV) de acordo com a equação:

$$CV = \frac{S}{X} \cdot 100 \quad (4)$$

Em que S é o desvio padrão relativo entre repetições e X é a média aritmética das medidas voltamétricas. A metodologia desenvolvida apresentou valores máximos de CV de 2,29% e 7,78% para repetitividade e precisão intermediária, respectivamente (Tabela 5). Os valores de coeficiente de variação se apresentaram abaixo de 20%, o que permite afirmar que a metodologia desenvolvida apresenta boa exatidão e que estão em acordo com o prescrito pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA 2011).

Exatidão

Para avaliar a exatidão do método, os procedimentos analíticos seguiram os ensaios de recuperação usando a técnica de adição padrão, visto que o método proposto neste trabalho apresentou efeito de matriz. Alíquotas de amostra de leite UHT desnatado, zero lactose foram intencionalmente contaminada por FPN em três níveis de concentrações (4,00 mg L⁻¹; 10,00 mg L⁻¹ e 14,00 mg L⁻¹), todos dentro da faixa de trabalho da curva analítica construída na presença da matriz. Para cada solução contaminada foram feitas quatro adições de 1,000 mg L⁻¹ de solução estoque de FPN. A partir destas medidas foi construída a relação de I_{pa} em função da concentração de analito e pelas equações de retas obtidas foi possível determinar a concentração inicial de cada amostra fortificada. As Figuras 13A, 13B e 13C apresentam, os gráficos e a regressão linear obtida para FPN em cada uma das concentrações adicionadas às soluções.

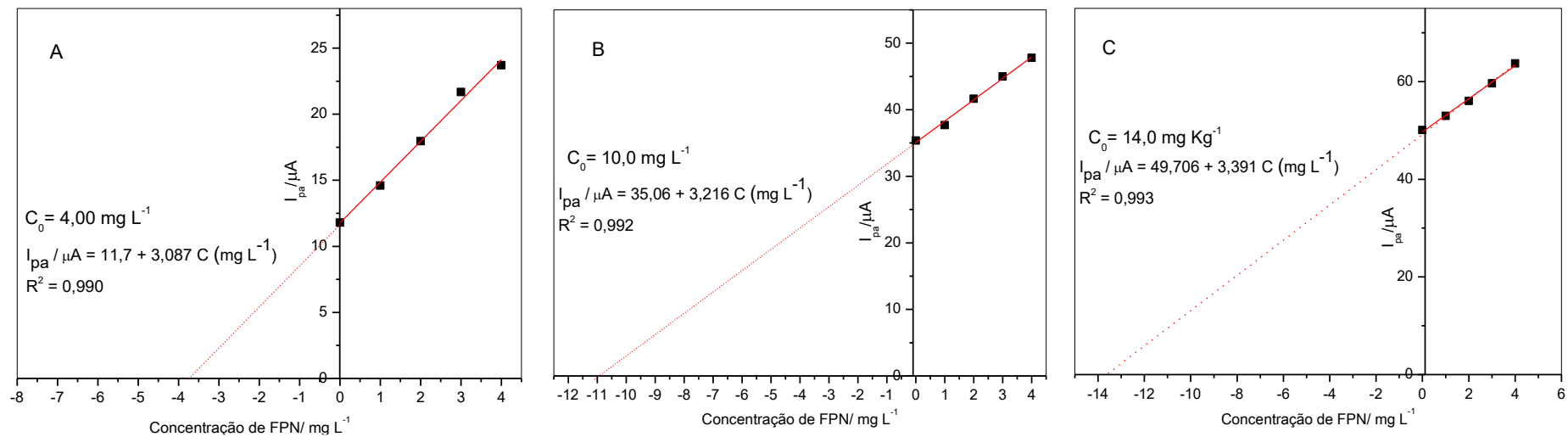


Figura 13. Relações voltamétricas entre I_{pa} e diferentes concentrações de leite UHT desnatado, zero lactose para fortificações de FPN em (A) $4,00 \text{ mg L}^{-1}$; (B) $10,00 \text{ mg L}^{-1}$ e (C) $14,0 \text{ mg L}^{-1}$

Na Tabela 5 encontram-se os valores de recuperação para cada um dos três níveis de concentração avaliados. A recuperação variou entre 91,34% e 101,05%, sendo aceitáveis para a aplicação adequada do método com amostras de alimentos de origem animal (entre 80% e 110%) (MAPA, 2011; Ribani *et al.*, 2004)

Tabela 5. Resultados dos ensaios de recuperação e precisão para diferentes concentrações de FPN adicionadas em amostras de leite UHT desnatado, zero lactose

Concentração adicionada / (mg L ⁻¹)	Concentração determinada/ (mg L ⁻¹)	Recuperação/ %	Repetitividade/ (CV %)	Precisão intermediária/ (CV %)
4,000	3,812	95,3	5,59	7,78
10,00	10,90	109,0	6,47	3,60
14,00	14,65	104,6	4,03	2,29

Seletividade e análise de interferentes

O estudo da seletividade foi realizado pela análise do branco, que consiste na solução de eletrólito de suporte, sem a presença do padrão analítico de FPN, e posteriormente analisando a solução contendo o padrão analítico (INMETRO, 2010). Sendo a seletividade avaliada qualitativamente pela observação da presença de picos de oxidação em potenciais próximos ou iguais ao potencial de oxidação de FPN. Este comportamento pode ser observado na Figura 10 que representa os voltamogramas obtidos para as curvas analíticas construídas na ausência e na presença de matriz juntamente com o branco de cada registro voltamétrico.

Com o intuito de assegurar que os picos de corrente monitorados são devido às atividades eletródicas dos analitos de interesse, avaliou-se o efeito da possível interferência de compostos normalmente encontrados no leite. Verificou-se a variação de I_{pa} da resposta voltamétrica de uma solução de FPN sob a influência da adição individual de 10, 50 e 100 vezes de lactose e de cálcio em relação à concentração de FPN.

Conforme pode ser observado na Figura 14A, a adição de lactose influenciou principalmente sobre I_{pa} . Quanto maior a concentração adicionada, menor a I_{pa} de FPN 10,00 mg L⁻¹ causando uma diminuição de cerca de 70 % em presença de lactose com concentração de 1,0 g L⁻¹, o que indica uma interferência considerável

deste composto na análise. Não ocorreu variação considerável de E_{pa} durante as análises. A interferência ocasionada pela lactose foi solucionada utilizando matriz isenta deste composto.

A adição de Ca^{2+} também não influenciou consideravelmente o E_{pa} de FPN, porém, a I_{pa} variou significativamente. A primeira concentração adicionada ($100,00 \text{ mg L}^{-1}$) ocasionou a diminuição de cerca de 84% de I_{pa} em relação à FPN $10,00 \text{ mg L}^{-1}$, entretanto, ao aumentar a concentração de Ca^{2+} , ocorre um aumento de I_{pa} como pode ser visto na Figura 14B.

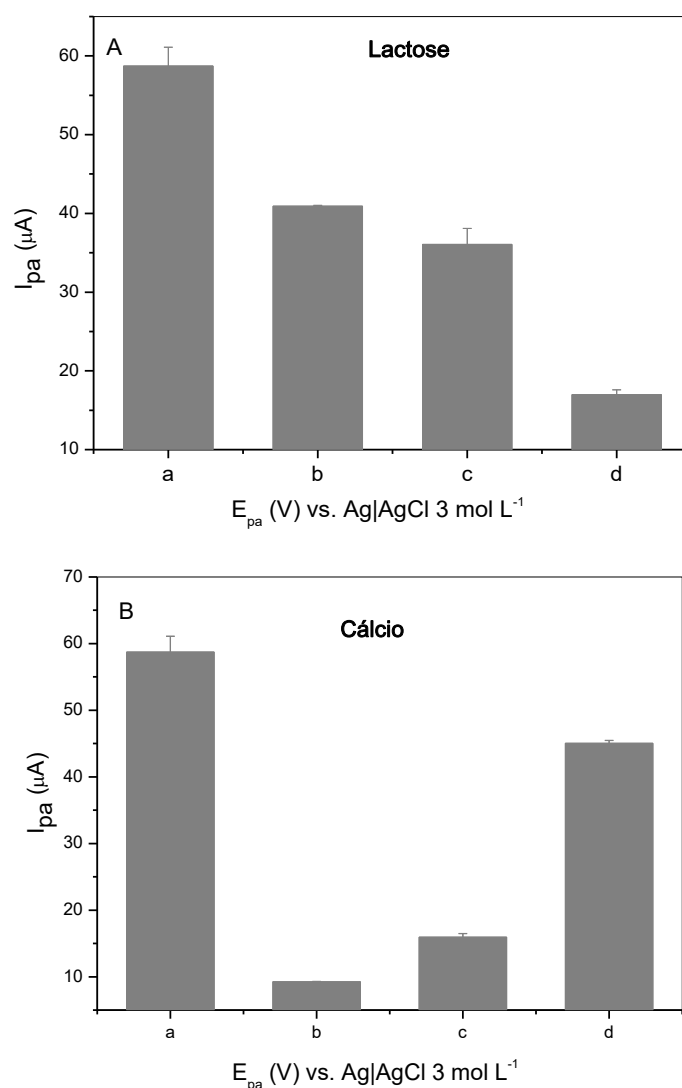


Figura 14. Variação de I_{pa} sobre as análises de: (A) (a) FPN $10,00 \text{ mg L}^{-1}$, (b) FPN $10,00 \text{ mg L}^{-1}$ e lactose 100 mg L^{-1} ; (c) FPN $10,00 \text{ mg L}^{-1}$ e lactose 500 mg L^{-1} (d) FPN $10,00 \text{ mg L}^{-1}$ e lactose 1 g L^{-1} (B) (a) FPN $10,00 \text{ mg L}^{-1}$, (b) FPN $10,00 \text{ mg L}^{-1}$ e Ca^{2+} 100 mg L^{-1} ; (c) FPN $10,00 \text{ mg L}^{-1}$ e Ca^{2+} 500 mg L^{-1} (d) FPN $10,00 \text{ mg L}^{-1}$ e Ca^{2+} 1 g L^{-1}

Considerando as características da composição química do leite, pode-se afirmar que o cálcio oferece maior influência sobre a análise, uma vez que as quantidades avaliadas são inferiores ao valor real de Ca^{2+} presente em amostras de leite bovino (260 mg de Ca^{2+} em 200 g de leite UHT desnatado, zero lactose).

Esse aumento de I_{pa} do sistema redox com a adição de Ca^{2+} pode ser explicado pela formação de um complexo bidentado entre FPN e Ca^{2+} , coordenado pelos pares de elétrons livres provenientes do grupo amino (NH_2) e do oxigênio, como apresentado na Figura 15. O aumento da concentração de Ca^{2+} levaria à formação de maior quantidade do complexo em solução gerando um aumento de I_{pa} atribuída à oxidação deste complexo.

Uma possível forma de diminuir a interferência de Ca^{2+} na análise de FPN é aumentar a concentração de íons H^+ em solução, para que ocorra a protonação da amina, porém como já mencionado, a diminuição do pH é inviável na determinação de FPN, devido à baixa solubilidade do mesmo. Outra forma de diminuir a interferência de Ca^{2+} ocorre por meio da adição de um agente complexante no meio, como por exemplo, o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) que poderia mascarar este metal, já que este possui E_{pa} em aproximadamente 0,2 V (Almeida *et al.*, 2014).

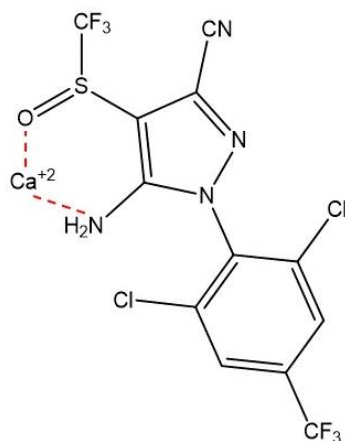


Figura 15. Estrutura proposta para o complexo de cálcio coordenado à fipronil.

Conclusão

Um método voltamétrico de triagem inédito, rápido, simples e de baixo custo foi desenvolvido para análise do carrapaticida fipronil em leite UHT desnatado, zero

lactose. Para o desenvolvimento desse método utilizou-se NaOH 0,100 mol L⁻¹ preparada em solução etanol-água 30% (v/v) como eletrólito de suporte e CPE 70:30% m/m de pó de grafite: óleo mineral, que apresentou maior intensidade de corrente de pico anódico em E_{pa}= +0,506 V por DPV, em relação à outros eletrodos de pasta de carbono modificados. A análise isolada de possíveis interferentes mostrou que a lactose e o cálcio presentes no leite bovino produzem uma interferência significativa na intensidade de corrente de pico da FPN, causando possível redução de sensibilidade do método.

Referências Bibliográficas

ALMEIDA, J. M. S.; DORNELLAS, R. M.; YOTSUMOTO-NETO, S.; GHISI, M.; FURTADO, J. G. C.; MARQUES, E. P. AUCÉLIO, R. Q.; MARQUES, A. L. B. A simple electroanalytical procedure for the determination of calcium in biodiesel. **Fuel**, v. 115, p. 658–665, 2014.

ANDREOTTI, R. Situação atual da resistência do carrapato-do-boi. *Documentos*. **EMBRAPA**, ISSN 1983-974X, 2010.

ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Programa Nacional De Análise De Resíduos De Medicamentos Veterinários Em Alimentos Expostos Ao Consumo – **Pamvet**. Brasília, 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 07 de agosto de 2018.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods**: fundamentals and applications. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.

BOBE, A.; COOPER, J. F.; COSTE, C. M.; MULLER, M. A. Behaviour of fipronil in soil under Sahelian plain field conditions. **Pesticide Science**, v. 52, n. 3, p. 275–281, 1998.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry** - Principles, Methods, and Applications. Nova York: Oxford University Press, 1993.

BRITO, L. G.; ROCHA, R. B.; NETTO, F. G. S.; BARBIERI, F. S.; OLIVEIRA, M. C. S.; GONÇALVES, M. A. R.; CARVALHO, G. L. O. Eficácia de carrapaticidas em rebanhos leiteiros de Rondônia. *Circular técnica*. **EMBRAPA**, ISSN 0103-9334, 2010.

BRONDI, S. H. G.; SOUZA, G. B.; NOGUEIRA, A. R. A.; CAMARGO, L. A.; MAJARON, R. F. Desenvolvimento e validação do método QuEChERS na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em leite e carne de búfalo. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 153–158, 2013.

CALDAS, S. S.; BOLZAN, C. M.; CERQUEIRA, M. B.; TOMASINI, D.; FURLONG, E. B.; FAGUNDES, C.; PRIMEL, E. G. Evaluation of a Modified QuEChERS Extraction of Multiple Classes of Pesticides from a Rice Paddy Soil by LC-APCI-MS / MS. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, p. 11918–

11926, 2011.

CHENG, Y.; DONG, F.; LIU, X.; XU, J.; MENG, W.; LIU, N.; CHEN, Z.; TAO, Y.; ZHENG, Y. Simultaneous determination of fipronil and its major metabolites in corn and soil by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 6, p. 1788–1795, 2014.

CID, Y. P.; FERREIRA, T. P.; MEDEIROS, D. M. V.; OLIVEIRA, R. M.; SILVA, N. C. C.; MAGALHÃES, V. S.; SCOTT, F.B. Determination of fipronil in bovine plasma by solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet detection. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2063–2066, 2012.

EL-DESOKY, H. S.; GHONEIM, M. M.; ABDEL-GALEIL, M. M. Stripping voltammetric methods for determination of the antiparasitic drug nitazoxanide in bulk form, pharmaceutical formulation and human serum. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 4, p. 669–679, 2010.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R.; PRATA, M. C. A. O carrapato dos bovinos e a resistência : temos o que comemorar ?, **A hora veterinária**, Ano 27, n. 159, 2007.

GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105–112, 2006.

GANT, D. B.; CHALMERS, A. E.; WOLFF, M. A.; HOFFMAN, H. B.; BUSHEY, D. F. Fipronil: action on the GABA receptor. **Reviews in Toxicology**, v. 2, p. 147–156, 1998.

HADJMOHAMMADI, M. R.; NIKOU, S. M.; KAMEL, K. Determination of Fipronil Residue in Soil and Water in the Rice Fields in North of Iran by RP-HPLC Method. **Acta Chimica Slovenica**, v. 53, p. 517–520, 2006.

HINGMIRE, S.; OULKAR, D. P.; UTTURE, S. C.; SHABEER, T. P. A.; BANERJEE, K. Residue analysis of fipronil and difenoconazole in okra by liquid chromatography tandem mass spectrometry and their food safety evaluation. **Food Chemistry**, v. 176, p. 145–151, 2015.

INMETRO. Instituto Nacional de Metereologia, Normalização e Qualidade.

Orientação sobre validação de métodos analíticos - DOQ-CGCRE-008 / Revisão 03, 2010.

IUPAC. International Union of Pure Applied Chemistry. **Spectrochimica Acta**, v. 241, 1978.

JIMÉNEZ, J. J.; BERNAL, J. L.; NOZAL, M. J.; MARTÍN, M. T.; MAYO, R. Comparative study of sample preparation procedures to determine fipronil in pollen by gas chromatography with mass spectrometric and electron-capture detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1146, n. 1, p. 8–16, 2007.

LACROIX, M. Z.; PUEL, S.; TOUTAIN, P. L.; VIGUIÉ, C. Quantification of fipronil and its metabolite fipronil sulfone in rat plasma over a wide range of concentrations by LC/UV/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 22, p. 1934–1938, 2010.

LI, M.; LI, P.; WANG, L.; FENG, M.; HAN, L. Determination and Dissipation of Fipronil and Its Metabolites in Peanut and Soil. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, p. 4435 - 4443, 2015.

LI, X.; HONGMEI, L.; WEN, M.; ZHEN, G.; XIUQIN, L.; SHANJUN, S.; HUA, T.; XIAOMIN, L.; QINGHE, Z. Development of precise GC-EI-MS method to determine the residual fipronil and its metabolites in chicken egg. **Food Chemistry**, v. 281, n. 18, p. 85–90, 2018.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 20, de 26 de julho de 2018**. Diário Oficial da União. Brasília, 2018.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de Garantia da Qualidade Analítica**. Brasília, p. 40, 2011.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Produtos veterinários**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios>>. Acesso em 07 de agosto de 2018.

MARCHESAN, E.; SARTORI, G. M. S.; AVILA, L. A.; MACHADO, S. L. O.; ZANELLA, R.; PRIMEL, E. G.; MACEDO, V. R. M.; MARCHESAN, M. G. Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio

- Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, Online, ISSN 0103-8478, 2010.
- MEIER, P. C.; ZÜND, R. E. **Statistical methods in analytical chemistry**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2000.
- MORETTI, S.; CRUCIANI, G.; ROMANELLI, S.; ROSANNA, R.; SALUTI, G.; GALARINI, R. Multiclass method for the determination of 62 antibiotics in milk. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 1429, p. 792–804, 2016.
- NICHOLSON, R. S.; SHAIN, I. Theory of Stationary Electrode Polarography. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems. **Analytical Chemistry**. v. 36, p. 706-723, 1964.
- OKUMURA, F.; AMARAL, R. B.; ORESTES, E.; MAZO, L. H. Electrochemical and Quantum Chemical Investigations of the Insecticide Fipronil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 5, p. 925–932, 2016.
- PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. D. S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190–1198, 2008.
- RIBANI, M.; BOTOLLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
- RUPP, E. B.; ZUMAN, P. Polarographic Determination of Some Pesticides . Application to Study of Their Adsorption on Lignin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 2016–2021, 1992
- SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S. Study of the electrochemical behavior and sensitive detection of pesticides using microelectrodes allied to square-wave voltammetry. **Electroanalysis**, v. 18, n. 9, p. 862–872, 2006.
- TINGLE, C. C. D.; ROTHER, J. A.; DEWHURST, C. F.; LAUER, S.; KING, W. J. Fipronil: Environmental Fate , Ecotoxicology , and Human Health Concerns. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. V. 176, p. 1–2, 2003.
- TINGLE, C. C. D.; ROTHER, J. A.; DEWHURST, C. F.; LAUER, S.; KING, W. J. Health and environmental effects of fipronil. **Pesticide Action Network UK**, 2000.

TOLEDO, C.; VALLE, L.; NARVÁEZ, J.; RITHER, P. Screening method for rapid determination of polychlorinated biphenyls in transformer oil by liquid-liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 937–942, 2007.

TOMASINI, D.; SAMPAIO, M. R. F.; CALDAS, S. S.; BUFFON, J. G.; DUARTE, F. A.; PRIMEL, E. G. Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 99, p. 380–386, 2012.

TU, Q.; HICKEY, M. E.; YANG, T.; GAO, S.; ZHANG, Q.; QU, Y.; DU, X.; WANG, J.; HE, L. A simple and rapid method for detecting the pesticide fipronil on egg shells and in liquid eggs by Raman microscopy. **Food Control**, v. 96, p. 16–21, 2019.

VAZ, C. M. P.; CRESTANA, S.; MACHADO, S. A. S.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A. Análise de pesticidas por técnicas eletroanalíticas. Comunicado técnico - EMBRAPA, n. 7, p.1-12, ISSN 1413-8244, 1996.

VÍLCHEZ, J. L.; Prieto, A.; Araujo, L.; Navalón, A. Determination of fipronil by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 919, p. 215–221, 2001.

WANG, T.; HU, J.; LIU, C. Simultaneous determination of insecticide fipronil and its metabolites in maize and soil by gas chromatography with electron capture detection. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, n. 5, p. 2767–2774, 2014.

WU, X.; YU, Y.; XU, J.; DONG, F.; LIU, X.; DU, P.; LIU, X.; DU, P. Residue analysis and persistence evaluation of fipronil and its metabolites in cotton using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–12, 2017.

ZHANG, M.; BIAN, K.; ZHOU, T.; SONG, X.; LIU, Q.; MENG, C.; HE, L. Determination of residual fipronil in chicken egg and muscle by LC – MS / MS. **Journal of Chromatography B**, v. 1014, p. 31–36, 2016.

3. CONCLUSÃO GERAL

O trabalho realizado possibilitou o desenvolvimento de dois métodos voltamétricos rápidos de triagem de resíduos dos medicamentos veterinários ronidazol e fipronil. Para o desenvolvimento dos métodos foram utilizadas as técnicas de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial. Os métodos desenvolvidos foram aplicados satisfatoriamente nas matrizes carne e leite bovino.

As técnicas voltamétricas podem ser aplicadas para o monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários, quando estes se apresentarem eletroativos, sendo uma alternativa viável para análises desta natureza. Ainda que as técnicas cromatográficas sejam muito utilizadas para este tipo de análise, estas apresentam limitações, como longo tempo nas etapas iniciais de preparação de amostras, maior quantidade de reagentes e alto custo com instrumentação e manutenção, o que eleva o custo final das análises. Como fatores limitantes à aplicação das técnicas voltamétricas, em âmbito laboratorial, pode-se mencionar a necessidade de um potenciostato e acessórios, definição dos parâmetros de análise, e escolha adequada do eletrodo de trabalho conforme o analito de interesse.

As aplicações dos ensaios voltamétricos neste estudo demonstraram limites de detecção e quantificação maiores em relação a método cromatográficos já desenvolvidos. Apesar disso, estes se apresentam como métodos de triagem alternativos á cromatografia, ressaltando principalmente a possibilidade dos mesmos serem realizados in loco e a rapidez nas análises.