

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

Alice Cristina Bastos de Souza

**Fipronil e produtos de degradação em
amostras de mel do sul do Brasil:
Desenvolvimento de uma abordagem
simples de microextração em gota
única usando solvente eutético
profundo magnético**

UFCSPA
**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2024**

Alice Cristina Bastos de Souza

Fipronil e produtos de degradação em amostras de mel do sul do Brasil: Desenvolvimento de uma abordagem simples de microextração em gota única usando solvente eutético profundo magnético

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador(a): Dr. Josias de Oliveira Merib
Coorientador(a): Dra. Eliane Dallegrove

Porto Alegre

Catálogo na Publicação

Bastos de Souza, Alice Cristina

Fipronil e dois produtos de degradação em amostras de mel do sul do Brasil: Desenvolvimento de uma abordagem simples de microextração em gota única usando solvente eutético profundo magnético / Alice Cristina Bastos de Souza. -- 2024.

59 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2024.

Orientador(a): Josias de Oliveira Merib ; coorientador(a): Eliane Dallegrave.

1. Agrotóxicos. 2. Mel. 3. Solvente eutético

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

INSTITUIÇÃO E FONTES FINANCIADORAS

O presente trabalho foi inteiramente desenvolvido na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), no laboratório Central Analítica do prédio 1. Contou com recursos financeiros provindos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 AGROTÓXICOS.....	11
1.1.2 FIPRONIL E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO	14
1.2 MEL.....	18
1.3 QUÍMICA VERDE.....	18
1.3.1 TÉCNICAS MINIATURIZADAS DE EXTRAÇÃO	20
1.3.2 MICROEXTRAÇÃO EM GOTA ÚNICA.....	20
1.4 MÉTRICA DE SUSTENTABILIDADE DE PREPARO DE AMOSTRA (SPMS).....	22
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3. ARTIGO CIENTÍFICO	25
4. DISCUSSÃO.....	52
4.1 OTIMIZAÇÃO	52
4.2 VALIDAÇÃO.....	54
4.3 MÉTRICA DE SUSTENTABILIDADE	54
5. CONCLUSÃO	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DES - Solvente eutético profundo, do inglês *deep eutetic solvent*

DLLME - Microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction*

GABA - Ácido gama-aminobutírico

GHS - Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos, do inglês *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*

HPLC-DAD - Cromatografia líquida de alta eficiência – detector por arranjo de diodos, do inglês *High-performance liquid chromatography-diode array detector*

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

LOD - Limite de detecção

LOQ - Limite de quantificação

LLE - Extração líquido-líquido, do inglês *liquid-liquid extraction*

LLME - Microextração líquido-líquido, do inglês *liquid-liquid microextraction*

LPME - Microextração em fase líquida, do inglês *liquid-phase microextraction*

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MDES - Solvente eutético profundo magnético, do inglês *magnetic deep eutectic solvent*

PPA - Potencial de Periculosidade Ambiental

QuEChERS - Rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro, do inglês Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe.

SBSE - Extração sortiva por barra de agitação, do inglês *Stir bar sorptive extraction*

SDME - Microextração em gota única, do inglês *single-drop microextraction*

SPE - Extração em fase sólida, do inglês *solid-phase extraction*

SPME - Microextração em fase sólida, do inglês *solid-phase microextraction*

SPMS - Métrica de Sustentabilidade no Preparo de Amostra, do inglês *sample preparation metric of sustainability*

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Fipronil e seus produtos de degradação.

Figura 2. Os 12 princípios da química verde.

Figura 3. Esquema de microextração em gota única por imersão direta.

Figura 4. Diagrama de avaliação mediante SPMS.

Figura 5. Otimização da diluição da amostra.

Figura 6. Superfícies de resposta obtidas para otimização das condições de extração.

Tabela 1. Lista das categorias de classificação toxicológica.

Tabela 2. Classificação toxicológica em função da toxicidade aguda oral, dérmica e inalatória dos agrotóxicos, utilizada na rotulagem dos produtos.

Tabela 3. Características físico-químicas do fipronil.

Tabela 4. Diferentes culturas que incluem a aplicação de fipronil.

RESUMO

O aumento no uso de agrotóxicos na agricultura moderna levou à contaminação ambiental, afetando biomas e causando diversos problemas nos ecossistemas. Nesse contexto, a morte massiva de abelhas, insetos não-alvo dos agrotóxicos, resulta em severos impactos socioeconômicos. Portanto, analisar a presença desses contaminantes no mel, o principal produto da apicultura no Brasil, representa uma ferramenta importante para o monitoramento ambiental. Neste estudo, uma nova metodologia analítica foi desenvolvida para a análise de fipronil, a principal causa de mortes de colônias de abelhas no Brasil, e dois de seus produtos de degradação, fipronil dessulfínico e fipronil sulfeto em amostras de mel. Foi empregada a microextração em gota única (SDME) usando um solvente eutético profundo magnético (MDES) como fase extratora, seguida por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). Os parâmetros de extração otimizados foram definidos como um volume de amostra de 4,5 mL de mel:água (1:6 v/v), 10 mg de MDES e 55 min de extração. É importante mencionar que a metodologia também foi semi-automatizada, permitindo seis extrações simultâneas. O método foi validado, fornecendo coeficientes de determinação superiores a 0,9939 e LODs e LOQs de 4,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 15 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, para ambos os analitos. A precisão intradia variou de 6,69% a 15,59%, a precisão interdia variou de 8,77% a 18,58% e a exatidão variou de 90,84% a 102,68%. A metodologia apresentou aspectos sustentáveis segundo métricas atualmente aceitas e foi aplicada para analisar quatro amostras de mel produzidas por pequenos produtores no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Palavras-chave: Mel, pesticida, solvente eutético profundo magnético, microextração em gota única.

ABSTRACT

The increased use of pesticides in modern agriculture has led to environmental contamination, affecting biomes and causing several problems in ecosystems. In this context, the massive death of bees, non-target insects of pesticides, results in severe socioeconomic impacts. Therefore, analyzing the presence of these contaminants in honey, the main product of beekeeping in Brazil, represents an important tool for the environmental monitoring. In this study, a novel analytical methodology was developed for the analysis of fipronil, the main cause of bee colony deaths in Brazil, and two of its degradation products, fipronil desulfinyl and fipronil sulfide in honey samples. Single-drop microextraction (SDME) using a magnetic deep eutectic solvent (MDES) as extraction phase was employed followed by high-performance liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD). The optimized extraction parameters defined the sample volume as 4.5 mL honey:water (1:6 v/v), 10 mg of MDES, and 55 min of extraction. It is important mentioning that the methodology was also semi-automated, allowing for six simultaneous extractions. The method was validated, providing coefficients of determination higher than 0.9939 and LODs and LOQs of $4.5 \mu\text{g L}^{-1}$ and $15 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively, for both analytes. Intraday precision ranged from 6.69% to 15.59%, interday precision ranged from 8.77% to 18.58%, and accuracy ranged from 90.84% to 102.68%. The methodology exhibited sustainable aspects according to recently developed metrics and it was successfully applied to analyze four honey samples produced by small-scale producers in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

Keywords: Honey, pesticide, magnetic deep eutectic solvent, single-drop microextraction.

1. INTRODUÇÃO

1.1 AGROTÓXICOS

A legislação brasileira descreve os agrotóxicos na LEI Nº 14.785, DE 27 DE DEZEMBRO DE 2023, como produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens ou na proteção de florestas plantadas, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos [1]. Os agrotóxicos, seus componentes e afins só podem ser produzidos, manipulados, importados, exportados, comercializados e utilizados no território nacional se previamente registrados no órgão federal competente, atendidas as diretrizes e exigências dos órgãos federais responsáveis pelos setores de agricultura, saúde e meio ambiente [2]. Os órgãos federais que realizam a avaliação dos agrotóxicos são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo este também responsável pelo registro [3].

A ANVISA utiliza critérios baseados nos parâmetros adotados pela Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) para avaliação, classificação e categorização toxicológica dos agrotóxicos, como mostrado nas **Tabela 1** e **Tabela 2** [4,5]. Além da avaliação para registro, a ANVISA também realiza reavaliações periódicas com base no risco à saúde humana, levando em consideração novas evidências de risco que surgirem [6].





Tabela 1. Lista das categorias de classificação toxicológica.

Classificação toxicológica em função da:

1. Toxicidade aguda oral (DL50 oral), cutânea (DL50 cutânea) e inalatória (CL50 inalatória)
2. Toxicidade para órgão-alvo específico por exposição única
3. Toxicidade para órgão-alvo específico por exposição repetida
4. Mutagenicidade
5. Carcinogenicidade
6. Toxicidade reprodutiva
7. Corrosão ou irritação cutânea
8. Corrosão ou irritação ocular
9. Sensibilização cutânea
10. Sensibilização respiratória

Fonte: Adaptado de Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019.

Tabela 2. Classificação toxicológica em função da toxicidade aguda oral, dérmica e inalatória dos agrotóxicos, utilizada na rotulagem dos produtos.

	Categoria 1	Categoria 2	Categoria 3	Categoria 4	Categoria 5	Não Classificado
	Produto Extremamente Tóxico	Produto Altamente Tóxico	Produto Moderadamente Tóxico	Produto Pouco Tóxico	Produto Improvável de Causar Dano Agudo	Produto Não Classificado
Pictograma					Sem símbolo	Sem símbolo
Palavra de advertência	PERIGO	PERIGO	PERIGO	CUIDADO	CUIDADO	Sem advertência
Classe de perigo						
Oral	Fatal se ingerido	Fatal se ingerido	Tóxico se ingerido	Nocivo se ingerido	Pode ser perigoso se ingerido	-
Dérmica	Fatal em contato com a pele	Fatal em contato com a pele	Tóxico em contato com a pele	Nocivo em contato com a pele	Pode ser perigoso em contato com a pele	-
Inalatória	Fatal se inalado	Fatal se inalado	Tóxico se inalado	Nocivo se inalado	Pode ser perigoso se inalado	-
Cor da Faixa	Vermelho PMS Red 199 C	Vermelho PMS Red 199 C	Amarelo PMS Yellow C	Azul PMS Blue 293 C	Azul PMS Blue 293 C	Verde PMS Green 347 C

Fonte: Adaptado de Ministério da agricultura e agropecuária, 2019.

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) faz a classificação baseada no Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA). Para realizar essa classificação, o IBAMA utiliza análises ambientais fundamentadas em testes laboratoriais, semi-campo e de campo. Estes testes abrangem diversas áreas multidisciplinares, como estatística, química, biologia, agronomia, pedologia e toxicologia, entre outras. Com base nesses dados, determina-se as propriedades físico-químicas e

ecotoxicológicas da substância química. Além disso, são obtidas informações sobre persistência, bioacumulação, transporte em solos nacionais e resíduos em matrizes ambientais, que ajudaram a entender o comportamento dos agrotóxicos nos diversos compartimentos do meio ambiente [7]. A partir dos resultados obtidos nos testes, classifica-se os agrotóxicos no PPA, conforme mostrado na **Tabela 3**.

Tabela 2. Classificação toxicológica em função da toxicidade ambiental.

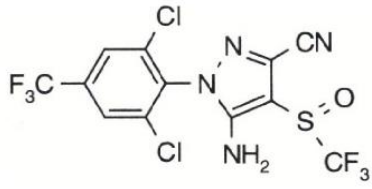
Classe I	Produto ALTAMENTE PERIGOSO ao meio ambiente
Classe II	Produto MUITO PERIGOSO ao meio ambiente
Classe III	Produto PERIGOSO ao meio ambiente
Classe IV	Produto POUCO PERIGOSO ao meio ambiente

O MAPA, por sua vez, avalia a eficiência agrônômica dos agrotóxicos e concede o registro de agrotóxicos. O MAPA também é responsável por monitorar os resíduos de agrotóxicos e afins em produtos de origem vegetal e animal [2].

1.1.2 FIPRONIL E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

O fipronil é um inseticida e cupinicida de ação de contato e ingestão pertencente ao grupo químico dos fenilpirazóis, desenvolvido em 1987 pela empresa francesa Rhône-Poulenc Agro, e registrado em 1993, entrando no mercado brasileiro em 2003 [8,9]. Algumas características físico-químicas bem como o aspecto de suas formulações estão incluídas na **Tabela 3**. Seu mecanismo de ação envolve o bloqueio não competitivo dos canais de cloro dos receptores de ácido gama-aminobutírico (GABA), resultando em hiperexcitação neuronal, paralisia e morte de insetos e ácaros.

Tabela 3. Características físico-químicas do fipronil.

Nome comum	Fipronil
Nome Químico	5-amino-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-[(1R,S)-(trifluoromethyl)sulfinyl]-1H-pyrazole-3-carbonitrile
Massa molar	437,15 g/mol
Fórmula molecular	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS
Fórmula estrutural	
Tipos de formulações	Aerossol
	Concentrado emulsionável
	Concentrado solúvel
	Granulado dispersível em água
	Isca granulada
	Isca em gel
	Isca em pasta
	Pó seco
Suspensão concentrada	

O IBAMA categoriza o fipronil como classe II (Muito perigoso ao meio ambiente), sendo altamente persistente ao meio ambiente, altamente tóxico para microcrustáceos, altamente tóxico para peixes e altamente tóxico para abelhas [10,11]. O uso deste agrotóxico está difundido em diversas culturas para diferentes alvos biológicos, sendo alguns destes relacionados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Diferentes culturas que incluem a aplicação de fipronil.

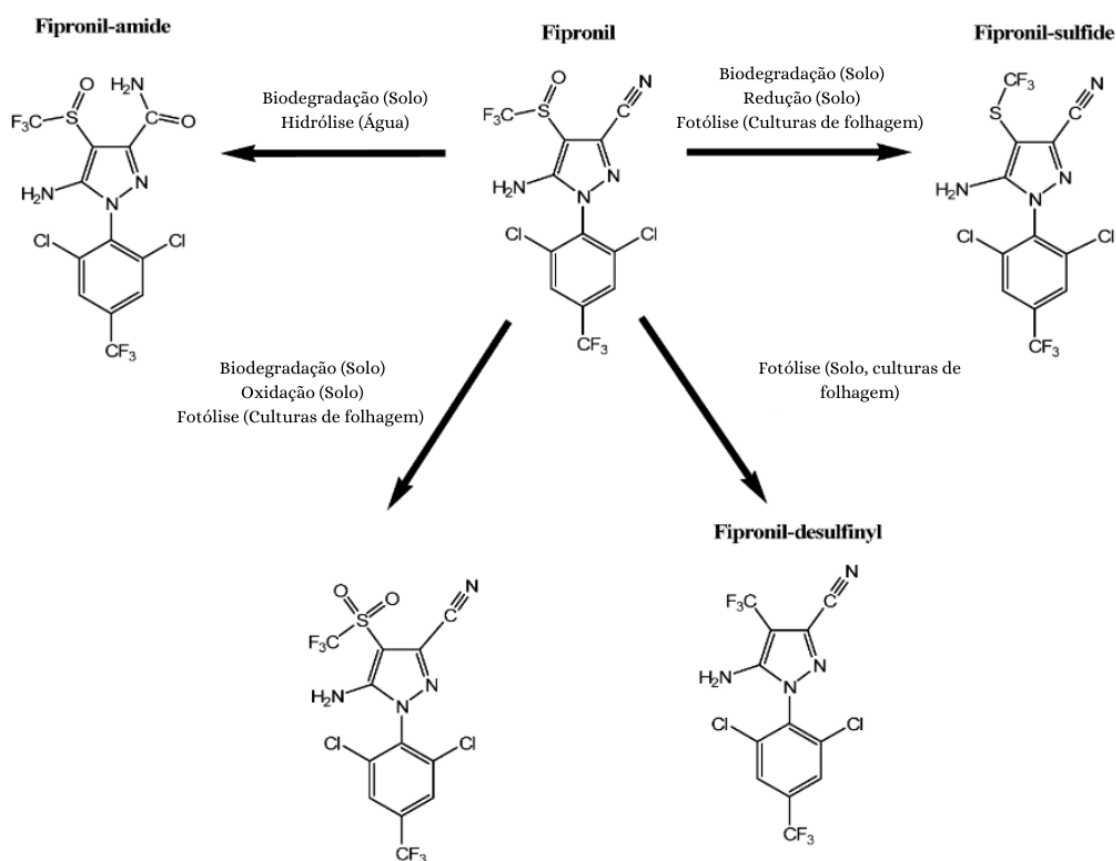
Cultura	Alvo biológico Nome comum/ (Nome científico)
Algodão	Curuquerê (<i>Alabama argilacea</i>)
	Bicudo (<i>Anthonomus grandis</i>)
	Tripes (<i>Frankliniella schultzei</i>)
Duboisia	Broca da Duboisia (<i>Cyrtomon luridus</i>)
Soja	Tamanduá-da-soja (<i>Sternechus susignatus</i>)
Batata	Vaquinha-verde-amarela (<i>Diabrotica speciosa</i>)
Cana de açúcar	Cupim (<i>Heterotermes tenuis</i>)
	Migdolus (<i>Migdolus fryanus</i>)
	Cupim (<i>Neocapritermes opacus</i>)
	Cupim (<i>Procornitermes triacifer</i>)
	Cupim (<i>Cornitermes cumulans</i>)
	Broca-da-cana (<i>Diatraea saccharalis</i>)
	Saúva parda (<i>Atta capiguara</i>)
Milho	Vaquinha-verde-amarela (<i>Diabrotica speciosa</i>)

	Pão-de-galinha (<i>Diloboderus abderus</i>)
--	---

Fonte: Adaptado de Nortox, 2023.

O fipronil possui produtos de degradação, oriundos de biodegradação, oxidação, redução, hidrólise (a pH 9) e fotodegradação, como mostrado na **Figura 1**. Entre os produtos de degradação, dois deles foram avaliados neste projeto, sendo eles o *Fipronil Desulfanyl* (Fipronil Dessulfanyl) e o *Fipronil sulfide* (Sulfeto de Fipronil). O *Fipronil desulfanyl* ocorre devido à fotólise, enquanto o *Fipronil sulfide* ocorre a partir de biodegradação por microrganismos, redução e fotólise. Assim como seu precursor, os produtos de degradação são persistentes no meio ambiente e tóxicos para insetos, microcrustáceos, peixes e insetos, em especial, para as abelhas [12].

Figura 1. Fipronil e seus produtos de degradação.



Fonte: Adaptada de A. S. Gunasekara e colaboradores, 2007.

1.2 MEL

A legislação brasileira define o mel como um produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colmeia [13]. A União Europeia, por sua vez, o define como um alimento doce natural produzido por abelhas *Apis mellifera*, composto por açúcares, predominantemente frutose e glicose, e em menores quantidades por ácidos orgânicos, enzimas e partículas sólidas derivadas da coleta do mel [14].

Por se tratar de uma matriz bastante complexa, o mel também possui diversos outros componentes que variam devido a mudanças climáticas, estágio de maturação, espécie da abelha produtora, tipo da flora, processamento e armazenamento. Em sua composição podem estar presentes em pequenas quantidades água, minerais, proteínas, aminoácidos, vitaminas e fungos [15,16]. Devido a essa complexidade do mel e a baixa concentração dos contaminantes, comumente são empregadas metodologias analíticas, como a microextração líquido-líquido e QuEChERS, conjuntamente à uma etapa de filtragem para remoção de impurezas, de modo a reduzir possíveis interferências analíticas [17,18].

1.3 QUÍMICA VERDE

A química verde surge, no começo dos anos 1990, devido à necessidade do desenvolvimento de produtos e processos químicos com redução ou eliminação do uso e da geração de substâncias perigosas ao homem e ao meio ambiente. A química verde baseia-se em doze princípios (**Figura 2**), criados para auxiliar no desenvolvimento de produtos e processos químicos sustentáveis [19]. A partir do surgimento dos princípios da química verde, surgiram os princípios da química analítica verde, que visam o desenvolvimento de metodologias analíticas sustentáveis com reduzido impacto ambiental.

Figura 2. Os 12 princípios da química verde.



Fonte: Adaptado de Anastas e colaboradores, 2010

A química analítica verde, devido às suas diferenças operacionais, adaptou e criou seus próprios 12 princípios, sendo eles: aplicação de técnicas analíticas diretas para evitar o tratamento de amostras; diminuição da quantidade e do volume de amostras; medições realizadas *in situ*; integração de processos e operações analíticas para economizar energia e reduzir o uso de reagentes; utilização de métodos automatizados e miniaturizados; evitar a utilização de derivatização; evitar a geração de grande volume de resíduos e gerenciá-los adequadamente; predileção por métodos multi-análitos ou multi-parâmetros; minimização do uso de energia; utilização preferencial de reagentes obtidos de fontes renováveis; eliminação ou substituição de reagentes tóxicos; aumento da segurança do operador [20].

1.3.1 TÉCNICAS MINIATURIZADAS DE EXTRAÇÃO

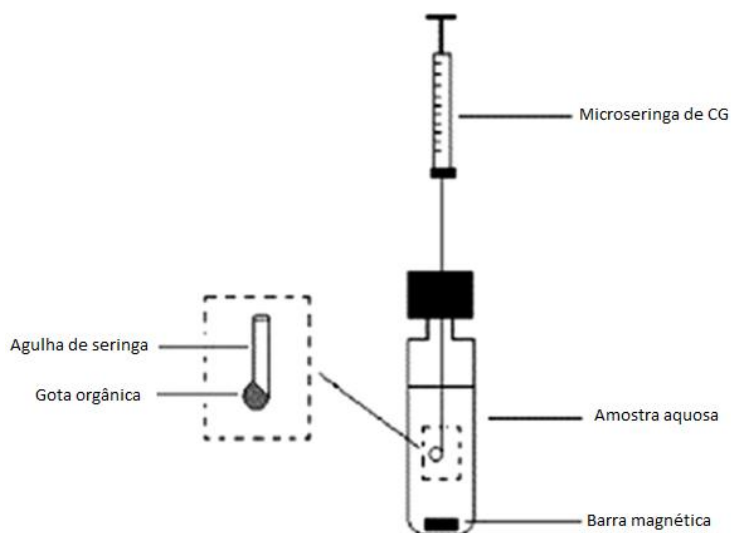
A etapa de preparo de amostra é crucial para o desempenho de uma metodologia analítica, pois é responsável pelo isolamento e concentração dos compostos de interesse (analitos) de suas matrizes. A extração está diretamente relacionada à confiabilidade dos resultados qualitativos e quantitativos das análises [21].

As técnicas de extração convencionalmente utilizadas em indústrias e laboratórios químicos são a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE). Sendo a LLE baseada na utilização de um solvente (geralmente orgânico) imiscível na amostra aquosa, e a SPE baseada na utilização de um material sorvente. As técnicas miniaturizadas, por sua vez, buscam aprimorar as metodologias tradicionais, de modo a diminuir os seus impactos ambientais, seguindo os princípios da química analítica verde, de minimizar o uso de matéria-prima, consumo de reagentes e energia, e a geração de resíduos. Entre as diversas técnicas miniaturizadas que surgiram a partir dos princípios da química analítica verde, pode-se citar a microextração em fase sólida (SPME), microextração em fase líquida (LPME) ou microextração líquido-líquido (LLME), microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e a microextração em gota única (SDME) [22,23].

1.3.2 MICROEXTRAÇÃO EM GOTA ÚNICA

A microextração em gota única (SDME) é uma alternativa à extração líquido-líquido convencional, caracterizada pela simplicidade no manuseio e aplicação, bem como, reduzido uso de solvente. Foi introduzida em 1995 em uma metodologia que visava extrair amônia e dióxido de enxofre em amostras de gás, utilizando um tubo de politetrafluoretileno como caminho de passagem do gás, e um capilar inserido dentro do tubo, com a gota retida na ponta. [24,25]. Posteriormente, a SDME foi adaptada, sendo uma das mais conhecidas a versão que utiliza uma seringa para injetar e suspender a gota (geralmente entre 1 e 3 μL) na amostra e, posteriormente, recolhê-la para análise, como mostrado na **Figura 3**. [26].

Figura 3. Esquema de microextração em gota única por imersão direta.



Fonte: Adaptado de Xu e colaboradores, 2007

A gota de solvente orgânico é a responsável pela extração dos analitos da matriz, desta forma o tipo de solvente empregado apresenta influência direta na eficiência do procedimento. Após o procedimento de extração, a gota é retraída na seringa e levada ao instrumento de análise. Tipicamente, a cromatografia gasosa (CG) é a técnica mais adequada quando se usa a SDME tendo em vista que todo o volume da gota pode ser volatilizado no injetor do cromatógrafo aquecido. Os solventes orgânicos mais empregados são o clorofórmio, tolueno e n-hexano. Infelizmente, estes solventes possuem grandes desvantagens principalmente devido a sua alta toxicidade e volatilidade. Outra desvantagem que deve ser destacada é a instabilidade da gota de solvente quando colocada diretamente na solução (imersão direta). Muitas vezes, esta gota é perdida durante a agitação na amostra o que representa uma clara limitação do procedimento.

Para contornar estes problemas, alternativas vêm sendo estudadas tais como a utilização de solventes mais sustentáveis, assim como, os solventes eutéticos profundos (DES) e o emprego de fases extratoras magnéticas que permitam uma maior estabilidade da gota de solvente extrator. Especificamente neste caso, os solventes eutéticos profundos que apresentam componentes magnéticos em sua estrutura química podem ser valiosas alternativas a serem exploradas.

1.3.3 SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS MAGNÉTICOS

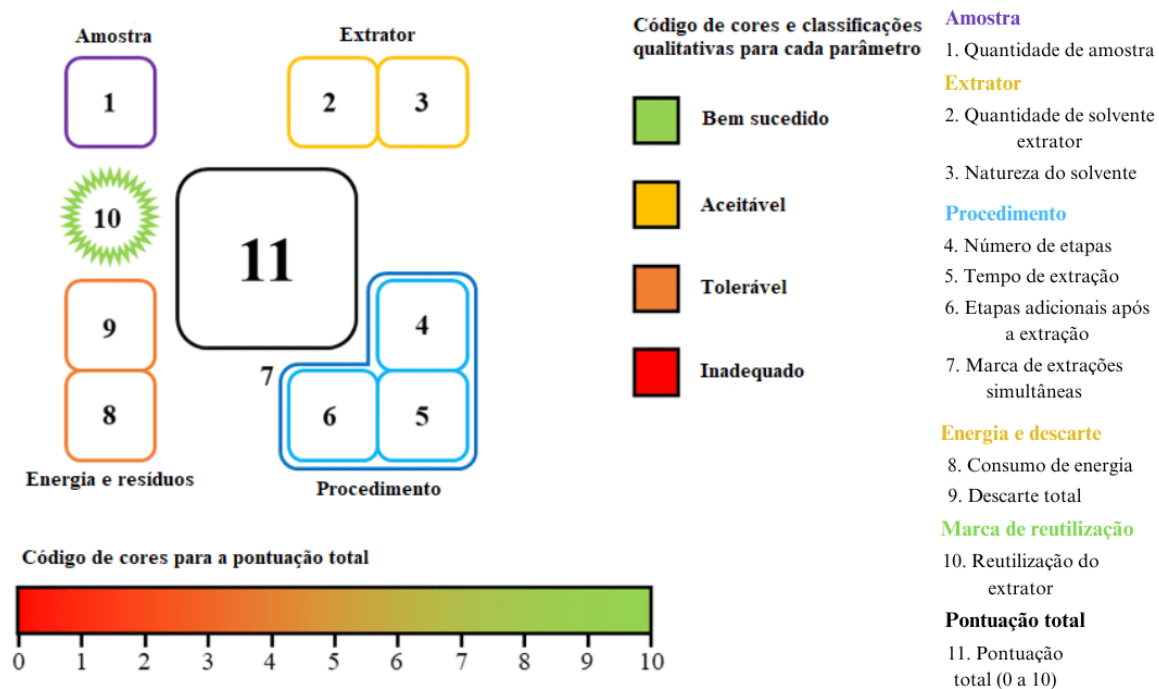
Solventes orgânicos, embora essenciais para diversos processos químicos, são, em sua maioria, tóxicos ao homem e ao meio ambiente. Desse modo, substituir esses solventes convencionais por solventes verdes tem o potencial de reduzir os riscos e o impacto ambiental envolvidos no uso de solventes, assim como reduzir o custo econômico associado a esse uso [28]. Nesse contexto, os solventes eutéticos profundos magnéticos (MDES) representam uma nova alternativa com grande potencial.

Os MDES são uma variante dos solventes eutéticos profundos, tendo como diferencial a adição de um componente com propriedades magnéticas, que os torna intrinsecamente paramagnéticos. Os DES são compostos químicos binários ou ternários formados por um doador de ligação de hidrogênio e um receptor de ligação de hidrogênio. São líquidos à temperatura ambiente, exibindo pontos de fusão mais baixos e densidades mais altas do que seus componentes individuais, apresentando alta estabilidade térmica, baixa volatilidade e alta viscosidade. Os MDES possuem comportamento semelhante às misturas eutéticas convencionais, diferindo essencialmente pelo comportamento magnético advindo de um átomo metálico incorporado em sua estrutura química [29,30].

1.4 MÉTRICA DE SUSTENTABILIDADE DE PREPARO DE AMOSTRA (SPMS)

A SPMS surge a partir da necessidade de avaliar quão sustentáveis são as novas técnicas analíticas que se baseiam nos princípios da química verde. A SPMS utiliza uma planilha de Excel para sua realização, nesta planilha são avaliadas cinco categorias que ao final gerarão uma pontuação de 0 a 10, sendo 10 o mais verde possível. O resultado é expresso em um diagrama de cores formado por diversos quadrados, sendo cada um referente a um subtópico dentro das cinco categorias (**Figura 4**) [31].

Figura 4. Diagrama de avaliação mediante SPMS.



Fonte: Adaptado de González-Martín e colaboradores, 2023.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma metodologia analítica empregando solvente eutético profundo magnético (MDES) para a determinação de fipronil, fipronil dessulfenil e fipronil sulfeto em amostras de mel através da técnica de microextração com gota única.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação da compatibilidade do MDES com o instrumento analítico HPLC-DAD (cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos);
- Examinar a capacidade extratora do MDES escolhido para os analitos;
- Otimizar e validar a metodologia desenvolvida;
- Aplicação da metodologia em amostras de mel obtidas de pequenos produtores de regiões do estado do Rio Grande do Sul.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo científico será submetido na revista *Food Analytical Methods* (Disponível em <https://link.springer.com/journal/12161>).

Normas da revista e instruções para elaboração do artigo podem ser consultados em: <https://link.springer.com/journal/12161/submission-guidelines>.

**Fipronil and two degradation products in honey samples from southern Brazil:
Development of a straightforward single-drop microextraction approach using
magnetic deep eutectic solvent**

Alice Cristina Bastos de Souza^{a,b}, Jared L. Anderson^c, Eliane Dallegrave^{a,d}, Josias

Merib^{a,b,d*}

^a Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil.

^c Departmento of Chemistry, Iowa State University, Ames, USA.

^d Departamento de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil.

Corresponding Author

E-mail address: josias@ufcspa.edu.br (J. Merib)

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

245, Sarmiento Leite St.

Porto Alegre RS, 90050-170

Phone: +55 51 33038883

Abstract

The increased use of pesticides in modern agriculture has led to environmental contamination, affecting biomes and causing several problems in ecosystems. In this context, the massive death of bees, non-target insects of pesticides, results in severe socioeconomic impacts. Therefore, analyzing the presence of these contaminants in honey, the main product of beekeeping, represents an important tool for the environmental monitoring. In this study, a novel analytical methodology was developed for the analysis of fipronil, the main cause of bee colony deaths in Brazil, and two of its degradation products, fipronil desulfinyl and fipronil sulfide in honey samples. Single-drop microextraction (SDME) using a magnetic deep eutectic solvent (MDES) as extraction phase was employed followed by high-performance liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD). The optimized extraction parameters defined the sample volume as 4.5 mL honey:water (1:6 v/v), 10 mg of MDES, and 55 min of extraction. It is important mentioning that the methodology was also semi-automated, allowing for six simultaneous extractions. The method was validated, providing coefficients of determination higher than 0.9939 and LODs and LOQs of $4.5 \mu\text{g L}^{-1}$ and $15 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively, for both analytes. Intraday precision ranged from 6.69% to 15.59%, interday precision ranged from 8.77% to 18.58%, and accuracy ranged from 90.84% to 102.68%. The methodology was applied to analyze four honey samples produced by small-scale producers in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

Keywords: Honey, pesticide, magnetic deep eutectic solvent, single-drop microextraction.

1. Introduction

The early 1990s marked the beginning of the exponential increase in pesticide use in Brazil. Importantly, the consumption of these chemicals surpassed that of the United States of America and China, two of the leading agricultural producers in the world. This fact is critical when considering the environmental pollution and health issues that can be associated with this large consumption. Therefore, strict regulations of these compounds are necessary to reduce the risks and prevent numerous problems. Contrarily, some laws and regulations recently approved in Brazil have permitted the new registration of several pesticides that certainly will bring additional environmental and health concerns in the next years (Moraes 2019).

The extensive use of agrochemicals in agricultural production has caused disruptions and changes in the environment due to contamination of animal populations and bioaccumulation of in the biotic and abiotic ecosystems (water, air, soil, and sediments). In this context, as an unintended effect of pesticide use, non-target insect species that do not interfere with agricultural production are also affected (Peres et al. 2003). Although this perspective may seem beneficial to agriculture and humankind, insects play an essential ecological role through pollination, decomposition of organic matter, substrate recycling, and the production of food, such as honey (Carvalho 2024). Bees have been severely impacted in recent years due to massive colony deaths, typically named “colony collapse disorder (CCD)” which refers to the sudden disappearance of colonies worldwide. Among the factors contributing to CCD are the use of pesticides, habitat loss due to agriculture and urbanization, climate change, nutritional deficiencies, improper colony management, pathogens, parasites, and predators (Pires et al. 2016).

Recently, the pesticide fipronil has been linked to an alarming number of hive deaths in Brazil (Pinto 2021; Costa 2019, Oliveira 2023). The situation has become so critical that the use of fipronil-based pesticides was provisionally suspended in December 2023 by the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA). The suspension, which covers the use of the pesticide through non-targeted spraying on soil or plants, aims to protect pollinating insects until a new analysis performed by IBAMA (2024). Fipronil is an insecticide and acaricide of the phenylpyrazole group, registered in Brazil in 2003. It is utilized in various agricultural crops and its mechanism of action involves the non-competitive blocking of chloride channels of γ -aminobutyric acid (GABA) receptors, leading insects to neuronal hyperexcitation, paralysis, and death (Nortox 2013; Holder et al. 2018). Its Maximum Residue Limit (MRL) determined by the European Union (2024) is $5 \mu\text{g kg}^{-1}$. Considering this serious situation, there is a need for the development and enhancement of efficient analytical methodologies with reduced environmental impact, capable of assessing pesticide contaminations commonly associated with bee mortality in honey samples, utilizing it as an environmental biomarker, capable of identifying and generating measures to mitigate the impacts of these pesticides on biotic systems.

Honey is defined by the European Parliament and Council of the European Union (2014) as a natural sweet food produced by *Apis mellifera* bees, comprised of sugars, predominantly fructose and glucose, and in smaller quantities by organic acids, enzymes, and solid particles derived from honey collection. Honey also contains other minor constituents such as water, minerals, proteins, amino acids, vitamins, and fungi. Variations in the physico-chemical composition of honey are common due to climatic changes, maturation stage, bee species, type of flora, processing, and storage (Crane 1975).

Due to its chemical profile, honey can be considered a highly complex matrix containing various chemical interferents, necessitating an efficient sample preparation step prior to the instrumental analysis. This stage allows for sample clean-up enhancing matrix compatibility with the instrumentation, also permitting a pre-concentration of the analytes by increasing the detectability of these compounds. In general, extraction techniques are employed for sample preparation, and modern trends toward miniaturization and reduction of solvent consumption are beneficial for both the environment and analyst safety.

Single-drop microextraction (SDME) is a solvent-based sample preparation technique in which a drop of water-immiscible extracting solvent is suspended in a microsyringe needle to permit the extraction of the analytes (Psillakis et al. 2002). In this experimental setup, the solvent drop, generally consisting of 1 to 3 μL , is immersed in the aqueous sample or maintained in the sample headspace for the extraction process. This technique exhibits satisfactory extraction capability with high preconcentration factors associated with low solvent consumption. On the other hand, issues with drop stability can be mentioned as a significant limitation particularly for direct immersion strategies. Recently, different classes of solvents have been successfully evaluated in SDME including magnetic ionic liquids (MILs) and deep eutectic solvents (DESs).

Deep eutectic solvents are gaining significant attention in sample preparation procedures due to sustainable aspects associated with satisfactory extraction efficiency. These solvents exhibit lower toxicity and reduced risk for both the environment and analyst. DESs are formed by binary or ternary mixtures involving a hydrogen bond donor (HBD) and a hydrogen bond acceptor (HBA). They are liquid at room temperature, exhibiting lower melting points and higher densities than their individual components, exhibiting high thermal stability, low volatility, and high viscosity (Andrade, 2022). Recently, a subclass

named magnetic-deep eutectic solvents (MDES) have been exploited. These solvents exhibit similar characteristics of DES but are intrinsically paramagnetic due to the magnetic components within their chemical structure (Aguirre 2022).

The aim of this study was to develop a novel and sustainable analytical methodology for the determination of fipronil, fipronil desulfinyl, and fipronil sulfide in honey samples through a SDME approach using MDES. In this regard, a high-throughput strategy was proposed using an adapted 96-well plate system in which up to six extractions could be performed simultaneously, followed by analysis using high-performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD). The experimental workflow was optimized through experimental design employing both univariate and multivariate approaches. Subsequently, the analytical parameters of merit were established, and the methodology was validated. The proposed methodology was compared with previous studies utilizing traditional sample preparation techniques. Additionally, the Sample Preparation Sustainability Metric (SPMS) was used to assess the sustainability of this methodology that was compared with traditional techniques.

2. Material and methods

2.1 Chemicals and Reagents

Analytical standards of fipronil, fipronil sulfide and fipronil desulfinyl (>99%) were provided by Sigma-Aldrich (Milwaukee, USA). Acetonitrile (ACN) HPLC-grade was provided by Merck (Darmstadt, Germany). Stock solutions of each analyte were prepared at a concentration of 1000 mg L⁻¹ by dissolving the solid standards in ACN. Subsequently, stock solutions containing a mixture of the three analytes were prepared by appropriate dilution of analytical standards in acetonitrile. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q purification

system by Millipore (Bedford, USA). Trioctylphosphine oxide (TOPO, >90%), neodymium(II) chloride hexahydrate (>99.9%), and octanoic acid (OA, >99%) was used for the preparation of MDES.

2.2 Instrumental

The extraction procedures were performed using an adapted 96-well plate system. The chromatographic analyses were performed using a Prominence LC-20AT high-performance liquid chromatograph coupled with a diode array detector (HPLC-DAD) from Shimadzu (Kyoto, Japan). Automatic injections of 20 μL were performed with a SIL-20A autosampler, also from Shimadzu. Separations were carried out using a C18 chromatographic column (4.6 mm x 250 mm; 5 μm) from Restek (Pennsylvania, USA), with the oven temperature maintained at 30 $^{\circ}\text{C}$. The separation was performed in isocratic mode with mobile phase comprised of 70% ACN (B) and 30% water (A) within 16 min. The mobile phase flow rate was 1.0 mL min^{-1} , and the detection wavelength was set at 230 nm. Some physico-chemical properties of the analytes, as well as the wavelengths used for the detection are shown in **Table S1** of the Supplementary Material. The LCSolution software (Shimadzu) was used for data treatment.

2.3 Preparation of the magnetic deep eutectic solvent

The preparation of the MDES evaluated in this study was performed according to a recently proposed procedure reported by Farook *et al.* (2022). Briefly, the hydrophobic MDES was prepared by mixing trioctylphosphine oxide (TOPO) that consisted of the HBA, the metal salt neodymium(III) chloride hexahydrate, and octanoic acid (OA) that acted as HBD. In this case, a molar ratio of 3:1:3 was adopted for HBA:metal salt:HBD, respectively.

Some physico-chemical properties of the MDES components are shown in **Table S2** of the Supplementary Material.

2.4 Samples

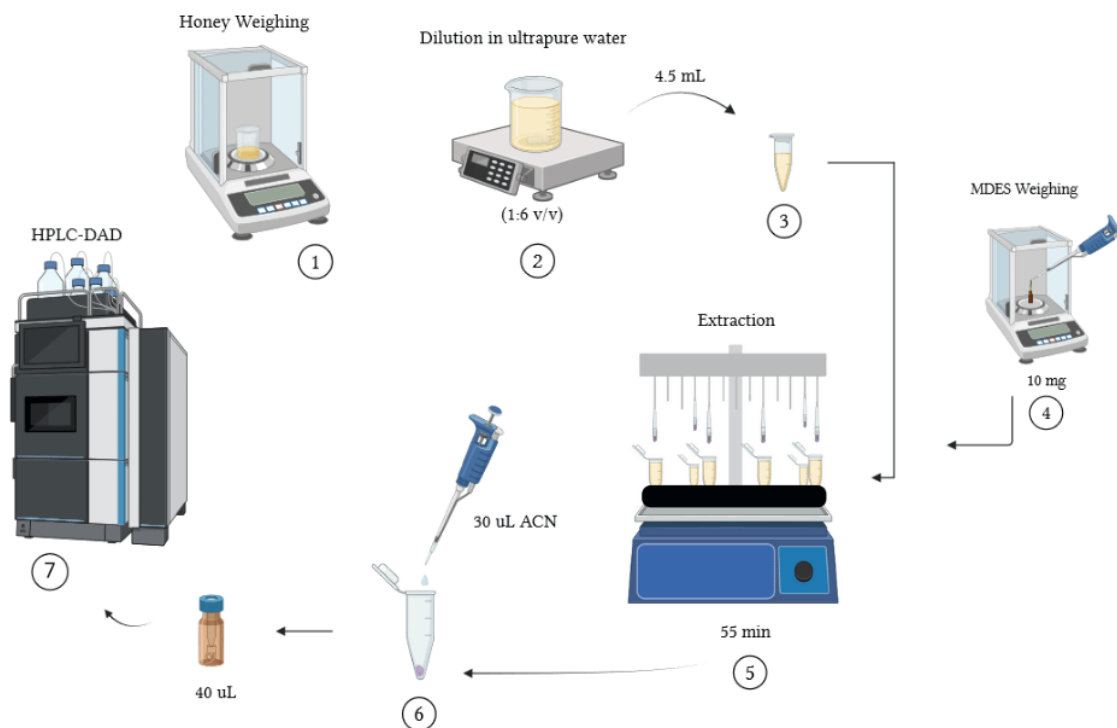
The samples were prepared at room temperature, using 14 g of honey free from the analytes, diluted in 60 mL of ultrapure water maintained under stirring. After dilution, 4.5 mL were transferred to 5 mL conical centrifuge tubes, resulting in a final honey mass per sample of 0.910 g with a volume of 0.643 mL. The samples were then spiked with a standard solution to achieve the desired concentration of each analyte and left to stand for 30 minutes. Subsequently, the samples were subjected to extractions following the methodology proposed in this study. After determining the analytical parameters of merit, four honey samples obtained from honey producers in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, were used to evaluate the applicability of the analytical methodology.

2.5 Experimental Procedure

The experimental procedure was based on single-drop microextraction (SDME) using MDES composed of 3 parts trioctylphosphine oxide (TOPO): 1 part neodymium(II) chloride hexahydrate: 3 parts octanoic acid (OA). Using an analytical balance, 10 mg of MDES were pipetted onto the tip of a neodymium rod magnet with a 5 mm diameter. Subsequently, the neodymium rod magnets were attached to the pins of an adapted 96-well plate system, enabling six simultaneous analyses. They were then immersed in the diluted honey samples for 55 minutes under gentle agitation for the extraction step. Subsequently, the MDES droplet was solubilized from the rod magnet using 30 μ L of ACN and manually

shaken to homogenize the mixture. Finally, 20 μL of the solution were analyzed by HPLC. A flowchart of the experimental procedure is shown in Figure 1.

Figure 1. Scheme of the optimized extraction procedure.



2.6 Optimization of the experimental conditions

Univariate and multivariate strategies were adopted to obtain the best experimental conditions for the methodology proposed in this study. Optimization was carried out in two stages to define the extraction conditions (sample volume, mass of MDES, extraction time and sample dilution). A central composite design with the variables mass of DES, sample volume, and extraction time was performed with 17 experiments with triplicates in the central point. The matrix of experiments carried out in this multivariate optimization is shown in **Table S3** of the Supplementary Material. Subsequently, the sample dilution was optimized using a univariate strategy. In the optimization steps, blank honey samples spiked

with 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ of each analyte were used. StatSoft Statistica 10 (StatSoft, USA) and Microsoft Excel 2016 (Microsoft, USA) were employed for the statistical evaluation.

2.7 Analytical parameters of merit

The methodology was validated according to the guidelines of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (2023). Limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), linearity, intra and interday precisions, and accuracy (relative recovery) were determined by calibration curves performed with five concentrations, with analyzes conducted in triplicate. The coefficients of determination (r^2) were calculated based on the calibration curves. The first concentration of the linear range was adopted as LOQ. LOD was obtained by dividing LOQ by 3.3. It is worth mentioning that the LOQs for the analytes were experimentally determined through extractions in triplicate, with coefficients of variation $\leq 20\%$ being considered satisfactory. Regarding relative recovery (accuracy), intraday and interday precisions were evaluated at three concentrations (LOQ, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, and 200 $\mu\text{g L}^{-1}$) for each analyte. Three extractions were performed on the same day to assess intraday precision ($n = 3$), and three assays each day were performed on three different days to estimate interday precision ($n = 9$). Four real samples, purchased from honey producers in the state of Rio Grande do Sul -Brazil, were analyzed to evaluate the applicability of the method developed.

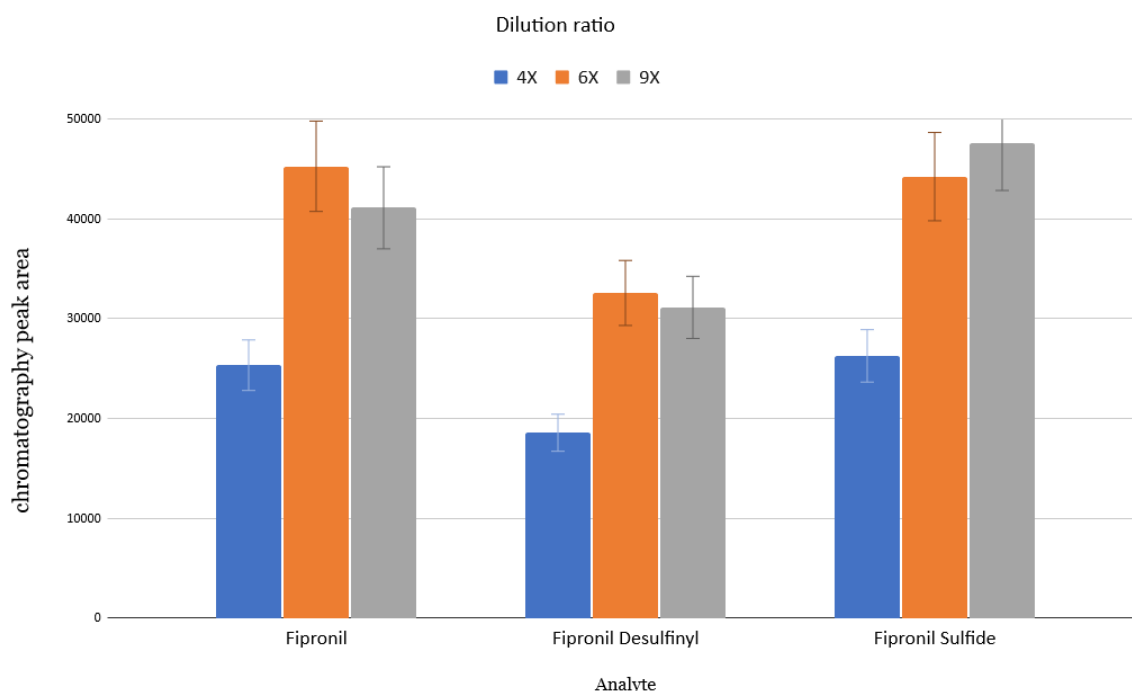
3. Results and discussion

3.1 Optimization of the experimental conditions

3.1.1 Sample dilution

Because of the high complexity of the matrix, a sample dilution was evaluated in order to reduce possible interferences caused by components found in honey. In this regard, a univariate design was conducted with three dilution ratios (4-fold, 6-fold, and 9-fold). A blank sample spiked with $500 \mu\text{g L}^{-1}$ of each analyte was used. According to **Figure 2**, the chromatographic peak areas of the analytes demonstrated that 6-fold dilution and 9-fold dilution provided better results compared to 4-fold dilution. Considering the standard deviation of these results 6-fold and 9-fold dilutions exhibited similar results, therefore 6-fold dilution was adopted for the further experiments.

Figure 2. Optimization of sample dilution.



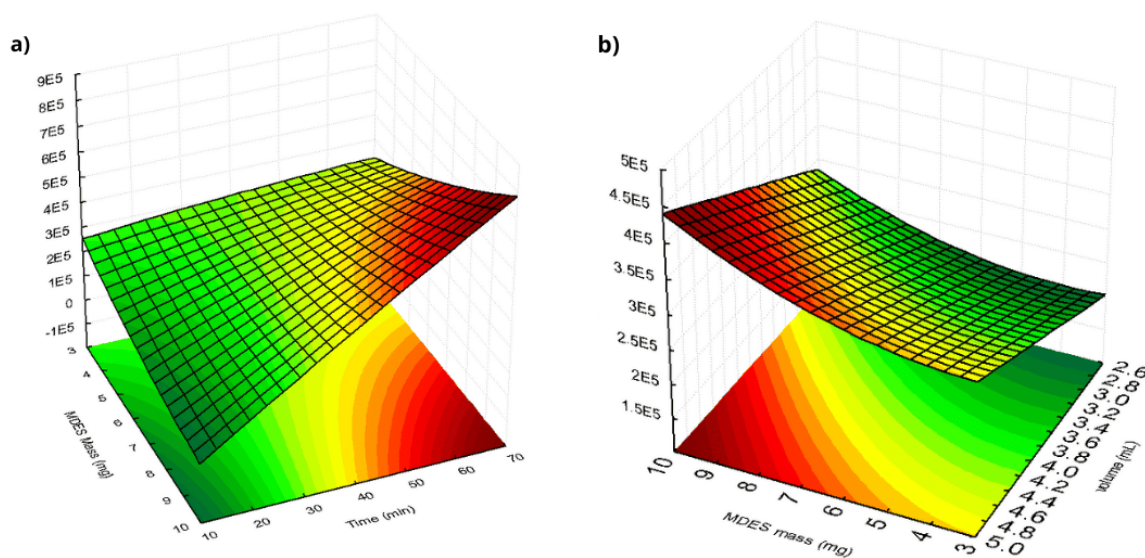
3.1.2 Optimization of the extraction step

The extraction step was optimized through a central composite design as previously described. In this optimization, 17 experiments were carried out using the variables sample volume, mass of MDES and extraction time. The response used to generate the statistical

model was the geometric mean of the chromatographic peak area of all analytes. The response surfaces obtained are shown in **Figure 3 (a and b)**.

The results from the response surfaces in **Figure 3** demonstrated greater efficiency when the sample volume, mass of MDES and extraction time were higher. The statistical model was significant and coefficient of determination (R^2) of 0.9441 considering 95% of confidence. Additionally, no lack of fit was observed in this optimization indicating that the statistical model proved to be adequate. Considering the results some experimental aspects, the optimized conditions were obtained with sample volume of 4.5 mL, mass of MDES of 10 mg, and the extraction time of 55 min.

Figure 3. Response surfaces obtained for the optimization of the extraction conditions.



3.2 Analytical parameters of merit and analysis of real samples

The analytical parameters of merit were obtained using the previously optimized experimental conditions. Calibration curves were performed with five concentrations in triplicate for each target compound. The linear ranges were obtained from 15 to 200 $\mu\text{g L}^{-1}$

and are the same for the three analytes. A chromatogram of the analytes is shown in **Figure S2** of the Supplementary Material. The coefficients of determination (r^2) of the calibration curves were greater than 0.9939, indicating good linearity. The LODs and LOQs were the same for the three analytes, $4.5 \mu\text{g L}^{-1}$ and $15 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Intraday precision ranged from 6.69% to 15.59%, and interday precision varied from 8.77% to 18.58%. Regarding accuracy, results ranged from 90.84% to 102.68%. For this evaluation of the analytical parameters of merit, a blank honey sample purchased from an ordinary supermarket and spiked with known concentrations of the analytes was used. All analytical figures of merit obtained in this study are shown in **Tables 1 and 2**.

Subsequently the optimization and validation of the methodology, four honey samples produced by small-scale beekeepers in different locations in Rio Grande do Sul, Brazil, were analyzed. The analytes were not detected in those honey samples. A chromatogram obtained after the SDME procedure using MDES of a spiked honey sample utilized in this investigation is shown in **Figure S2** of the Supplementary Material.

The analytical features of the method developed in this study were also compared with other methods reported in the literature for the determination of fipronil in honey, as shown in **Table 3**. Despite exhibiting limit of quantification (LOQ) slightly higher than methodologies using LC-MS/MS, this study was developed using a less sophisticated and cheaper instrumentation (HPLC-DAD). Specifically related to the sample preparation step, the SDME procedure using MDES offered several advantages including the use of an environmentally friendly solvent (MDES) which is an important alternative to traditional organic solvents, and low volumes of solvent compared to traditional extraction techniques. Importantly, a semiautomated workflow permitting simultaneous execution of multiple samples increased the sample throughput of this methodology. In this case, the use of a

MDES with aid of rod magnets featured additional drop stability compared to classical SDME-based approaches.

3.3 Greenness evaluation

Following the trend established by the principles of green chemistry, which aims to reduce or eliminate the use and generation of hazardous substances in chemical processes (Anastas et al. 2010), analytical chemistry has developed more sustainable sample preparation methodologies. In order to evaluate the greenness aspects of the developed methodology, the recently proposed Sample Preparation Sustainability Metric (SPMS) was utilized (González-Martín et al. 2023).

The metric is based on four categories, each with different weights and metric parameters, to assess the relative impact of the sample preparation method. The categories include: 1) sample amount; 2) extraction solvent (quantity, toxicity nature, and reuse); 3) procedure information (number of steps, extraction time, additional steps post-extraction); 4) energy consumption and waste. The metric uses a scale from 0 to 10, where 0 represents an environmentally inadequate methodology, while 10 represents the greenest possible methodology. The category values, as well as the total value, are represented in a grid figure based on a color code, where the qualitative classification for each parameter is indicated by a color code: green (successful); yellow (acceptable); orange (tolerable); red (inadequate).

The approach developed in this study achieved a score of 7.26, as shown in **Figure 4**. According to the figure, the procedure is considered “green” with all parameters ranging from tolerable to successful. The highest-rated aspects were sample volume, volume of

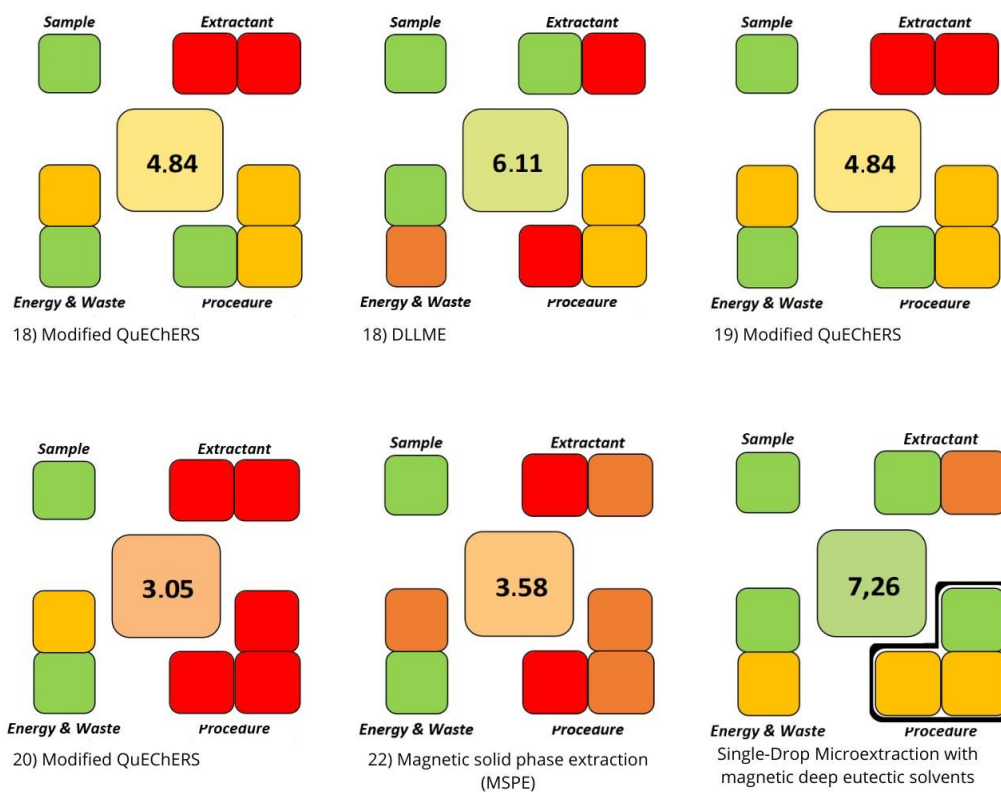
extraction solvent, number of extraction steps, and volume of residues. Another notable point is the simultaneous execution of multiple samples using the semiautomated adapted 96-well plate system. On the other hand, the result categorized as tolerable is related to the nature of the solvent, designated as a persistent alternative.

Figure 4. Scores using SPMS metrics.



The SPMS metric was used to compare the sustainability of the developed methodology with other methods reported in the literature that also analyze fipronil in honey, as shown in **Table 3** and **Figure 5**. The developed methodology presents significant advantages in terms of sustainability compared to other methodologies. The main highlights are the small volume of extraction solvent, the low volume of waste, and the reduced number of steps required in the extraction procedure.

Figure 5. Comparison of SPMS methodologies for the analysis of fipronil in honey.



4. Conclusion

In this study, a sustainable analytical methodology was developed and optimized for the analysis of fipronil, fipronil desulfinyl, and fipronil sulfide in honey, characterized by its low environmental impact. The methodology is based on the use of a magnetic deep eutectic solvent, employed in single-drop microextraction, with analysis performed using a high-performance liquid chromatography system with a diode array detector (HPLC-DAD). The analytical parameters of merit and sustainability were compared with previous studies involving techniques for the analysis of fipronil in honey, providing a feasible and sustainable alternative. In summary, the method stands out for its notable advantages, such as low solvent consumption, reduced waste production, and the ability to perform multiple extractions simultaneously.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

Authors are grateful to the Brazilian governmental agency Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) for the financial support that made this research possible with particular thanks to Central Analítica Laboratory (UFCSPA) for providing some instruments used in this study.

References

- Aguirre, M. Á., & Canals, A. (2022). Magnetic deep eutectic solvents in microextraction techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 146, 116500. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116500>
- Anastas, P., & Eghbali, N. (2010). Green chemistry: principles and practice. *Chemical Society Reviews*, 39(1), 301-312. <https://doi.org/10.1039/B918763B>
- Andrade, D. C., Monteiro, S. A., & Merib, J. (2022). A review on recent applications of deep eutectic solvents in microextraction techniques for the analysis of biological matrices. *Advances in Sample Preparation*, 1, 100007. <https://doi.org/10.1016/j.sampre.2022.100007>
- Câmara dos Deputados. (2023). Apicultores denunciam a mortandade de abelhas por agrotóxicos e cobram banimento imediato do fipronil. Notícias. Retrieved from <https://www.camara.leg.br/noticias/1019207-apicultores-denunciam-a-mortandade-de-abelhas-por-agrotoxicos-e-cobram-banimento-imediato-do-fipronil/>. Accessed August 15, 2024.
- Carvalho, M. (2024). O que aconteceria se os insetos fossem extintos do mundo? Entenda a importância desses pequenos animais. Retrieved from <https://butantan.gov.br/noticias/o-que-aconteceria-se-os-insetos-fossem-extintos-do-mundo-entenda-a-importancia-desses-pequenos-animais>. Accessed August 15, 2024.
- Costa, F. (2019). Agrotóxicos podem ter causado a morte de 480 milhões de abelhas no RS. *Jornal da Universidade da UFRGS*. Retrieved from <https://www.ufrgs.br/jornal/agrotoxicos-podem-ter-causado-a-morte-de-480-milhoes-de-abelhas-no-rs/>. Accessed August 15, 2024.
- Crane, E. (1975). Honey: A comprehensive survey (1th ed.). Eva Crane. Composition of honey (pp. 157-194). Bee Research Association.

European Commission. (2024). Regulation (EU) 2024/347 of 22 January 2024 amending Annexes II and V to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for fipronil in or on certain products. Official Journal of the European Union, L 2024/347, 23 January 2024. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=OJ:L_202400347

European Parliament and Council of the European Union. (2014). Directive 2014/63/EU of the European Parliament and of the Council of 15 May 2014 amending Council Directive 2001/110/EC relating to honey. Official Journal of the European Union, L 164, 1-5.

Farooq, M. Q., Tryon-Tasson, N., Biswas, A., & Anderson, J. L. (2022). Preparation of ternary hydrophobic magnetic deep eutectic solvents and an investigation into their physicochemical properties. *Journal of Molecular Liquids*, 365, 120-135. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.120135>

González-Martín, R., Gutiérrez-Serpa, A., Pino, V., & Sajid, M. (2023). A tool to assess analytical sample preparation procedures: Sample preparation metric of sustainability. *Journal of Chromatography A*, 1707, 464291. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464291>

Guidelines for Standard Method Performance Requirements Official Methods of Analysis of AOAC International. (2023). Oxford University Press.

Holder, P. J., Jones, A., Tyler, C. R., & Cresswell, J. E. (2018). Fipronil pesticide as a suspect in historical mass mortalities of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(51), 13033-13038. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804934115>

Ibama. (2024). Ibama suspende cautelarmente aplicação de agrotóxicos à base de fipronil. Notas. Retrieved from <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/notas/2024/ibama-suspende-cautelarmente-aplicacao-de-agrotoxicos-a-base-de-fipronil>. Accessed August 15, 2024.

Liu, Z., Wang, J., Wang, Z., Xu, H., Di, S., Zhao, H., ... & Wang, X. (2022). Development of magnetic solid phase extraction using magnetic amphiphilic polymer for sensitive analysis of multi-pesticides residue in honey. *Journal of Chromatography A*, 1664, 462789. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462789>

Moraes, R. F. (2019). Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória (No. 2506). Texto para Discussão.

Nortox S.A. (2013). Fipronil 800 WG: Bula. *Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP*. Retrieved from https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/fitossanidade/joaquimgoncalvesmachadone to/fipronil_800_bula-nortox.pdf

Peres, F., Moreira, J. C., & Dubois, G. S. (2003). Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. *É veneno ou é remédio*, 21-41.

Pinto, E. (2021). Inseticida fipronil é encontrado em 77% de amostras de colmeias com mortandade de abelhas no RS. Portal do Estado do Rio Grande do Sul. Retrieved from <https://estado.rs.gov.br/inseticida-fipronil-e-encontrado-em-77-de-amostras-de-colmeias-com-mortandade-de-abelhas-no-rs>. Accessed August 15, 2024.

Pires, C. S. S., Pereira, F. D. M., Lopes, M. T. D. R., Nocelli, R. C. F., Malaspina, O., Pettis, J. S., & Teixeira, É. W. (2016). Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD?. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51, 422-442. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500003>

Psillakis, E., & Kalogerakis, N. (2002). Developments in single-drop microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(1), 54-64. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(01\)00126-](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(01)00126-1)

Tomasini, D., Sampaio, M. R. F, Cardoso, L. V., Caldas, S. S., & Primel, E. G. (2011). Comparison of dispersive liquid–liquid microextraction and the modified QuEChERS method for the determination of fipronil in honey by high performance liquid chromatography with diode-array detection. *Analytical Methods*, 3(8), 1893-1900. <https://doi.org/10.1039/C1AY05221G>

Tomasini, D., Sampaio, M. R. F, Caldas, S. S., Buffon, J. G., Duarte, F. A., & Primel, E. G. (2012). Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*, 99, 380-386. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.05.068>

Zheng, W., Park, J. A., Abd El-Aty, A. M., Kim, S. K., Cho, S. H., Choi, J. M., ... & Shin, H. C. (2018). Development and validation of modified QuEChERS method coupled with LC–MS/MS for simultaneous determination of cymiazole, fipronil, coumaphos, fluvalinate, amitraz, and its metabolite in various types of honey and royal jelly. *Journal of Chromatography B*, 1072, 60-69. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.11.011>

Table 1. Limits of detection and quantification, coefficients of determination and linear equation for the method proposed in this study.

Analyte	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	Linear equation
Fipronil	4.5	15.0	0.9939	$y = 0.6891x + 0.095$
Fipronil Desulfide	4.5	15.0	0.9944	$y = 0.5187x + 1.176$
Fipronil Sulfide	4.5	15.0	0.9939	$y = 0.7396x + 1.9448$

Table 2. Relative recovery and precisions for the target compounds in honey samples.

Analyte	Spiked concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Relative Recovery (%) n=3	Precision (RSD, %)	
			Intraday (n=3)	Interday (n=9)
Fipronil	15	102.68	9.01	11.05
	100	91.98	8.29	13.58
	200	101.07	6.69	8.77
Fipronil Desulfide	15	90.90	12.31	17.54
	100	94.16	9.78	15.58
	200	97.36	8.82	9.38
Fipronil Sulfide	15	97.97	14.30	18.58
	100	90.84	15.59	14.27
	200	102.31	11.80	12.14

Table 3. Comparison with other analytical methodologies for the determination of fipronil in honey samples.

Sample preparation technique	Mass of honey	Extraction/desorption solvent	Volume/mass of extracting or desorptive solvent	Other reagents	Instrumentation	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Reference
Modified QuEChERS	5.00 g	ACN	10 mL	Anhydrous MgSO_4	HPLC-DAD	600.00 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Tomasini et al. 2011
Dispersive liquid-liquid microextraction	1.00 g	Carbon tetrachloride	0.1 mL	ACN, MeOH	HPLC-DAD	30.00 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Tomasini et al. 2011
Modified QuEChERS	10.00 g	ACN	10 mL	NH_4OH , Anhydrous MgSO_4	LC-APCI-MS/MS	10.00 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Tomasini et al. 2012
Modified QuEChERS	2.00 g	ACN	12 mL	Na_2HPO_4 , MgSO_4 , NaCl, sodium citrate, sodium citrate dibasic sesquihydrate tribasic dihydrate	LC-MS/MS	1.00 $\mu\text{g kg}^{-1}$ *	Zheng et al. 2018
Magnetic solid phase extraction	10.00 g	ACN (0,1% formic acid)	5 mL	MeOH	LC-MS/MS	0.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ *	Liu et al. 2022
SDME	0.91 g	MDES	10 mg	ACN		10.60 $\mu\text{g kg}^{-1}$	This study

*Within the MRL of 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ established by the European Union

Table S1. Chemical structure, molecular weight, retention time and logP for the target analytes.

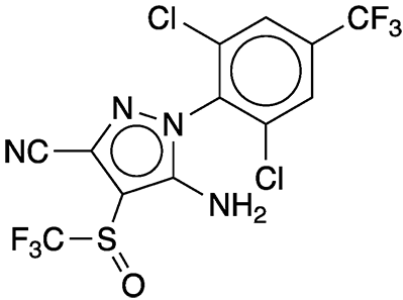
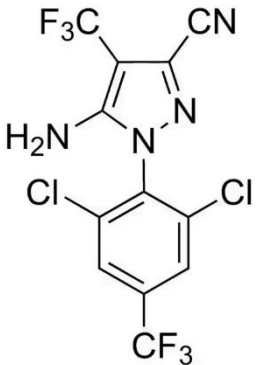
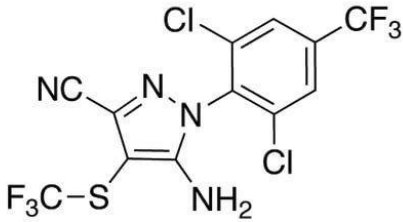
Analyte	Chemical structure	Molecular weight (g mol ⁻¹)	Retention time (min)	LogP
Fipronil		437.10	7.35	4.5
Fipronil Desulfinyl		389.08	8.10	4.6
Fipronil-Sulfide		421.10	9.59	5.5

Table S2. Chemical structure, molecular weight logP for the MDES components.

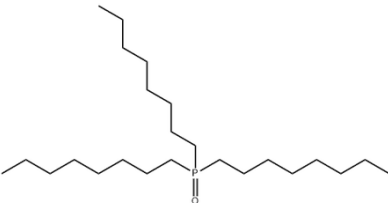
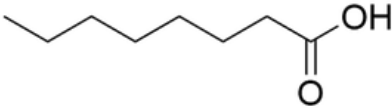
Chemical compound	Chemical structure	Molecular weight (g mol ⁻¹)	LogP
Trioctylphosphine oxide		386.6 g/mol	9.6
Octanoic acid		144.21 g/mol	3
Neodymium(II) chloride hexahydrate	$\text{NdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	358.69 g/mol	N/A

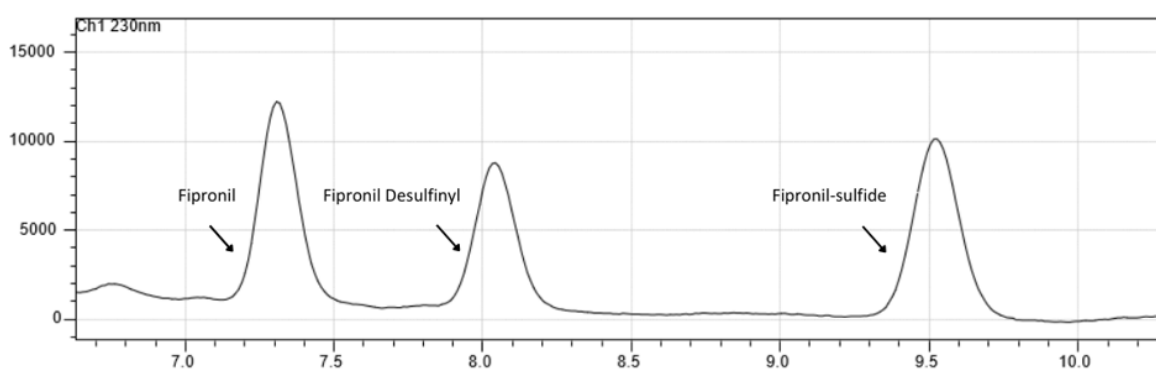
Table S3 – Matrix of the experiments for the central composite design used in this study.

	Variable levels				
	(-1.68)	(-1.00)	0.00	(+1.00)	(+1.68)
Mass of MDES	4 mg	5 mg	6,5 mg	8 mg	9 mg
Extraction time	14.5 min	25 min	40 min	55 min	65.5 min
Sample volume	2.6 mL	3.1 mL	3.8 mL	4.5 mL	5 mL

Experiment	Coded experiments		
	Mass of MDES	Extraction time	Sample volume
1	-1.00	-1.00	-1.00
2	-1.00	-1.00	1.00
3	-1.00	1.00	-1.00
4	-1.00	1.00	1.00
5	1.00	-1.00	-1.00
6	1.00	-1.00	1.00
7	1.00	1.00	-1.00
8	1.00	1.00	1.00
9	-1.68	0.00	0.00
10	1.68	0.00	0.00
11	0.00	-1.68	0.00

12	0.00	1.68	0.00
13	0.00	0.00	-1.68
14	0.00	0.00	1.68
15	0.00	0.00	0.00
16	0.00	0.00	0.00
17	0.00	0.00	0.00

Figure S2. Chromatogram obtained from purchased honey sample spiked with $100 \mu\text{g L}^{-1}$ of the analytes.



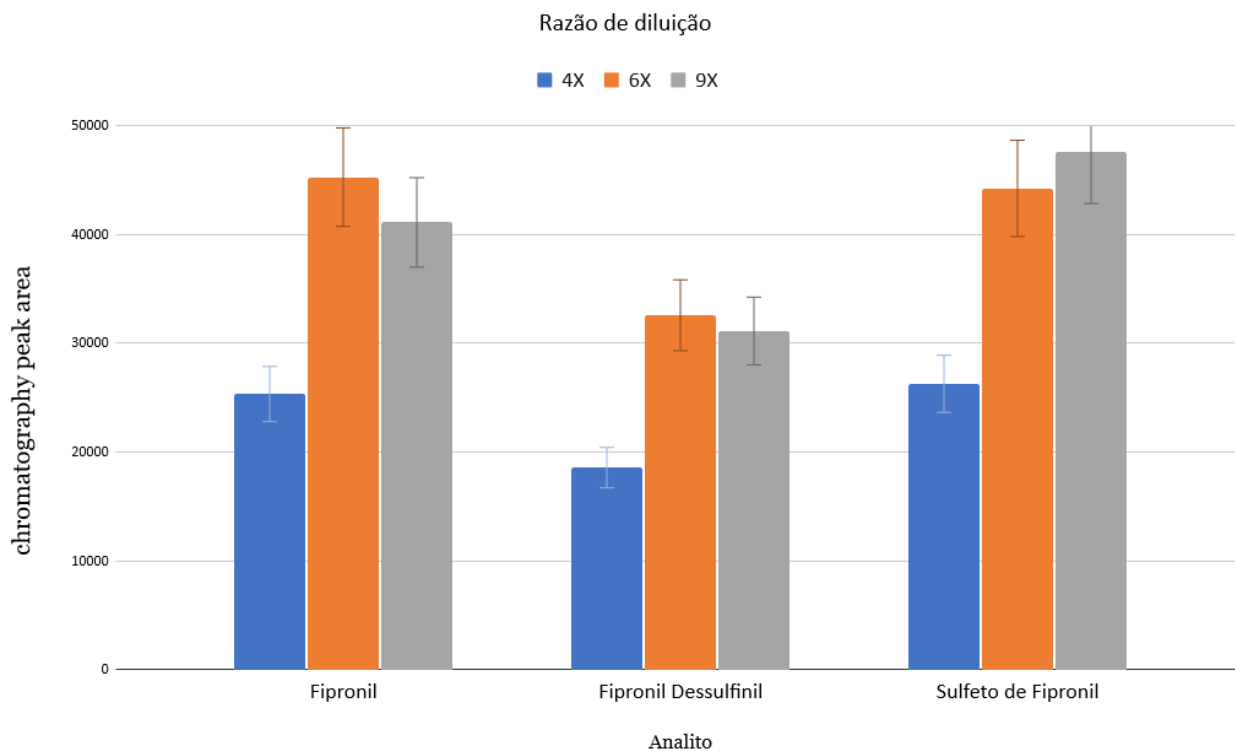
4. DISCUSSÃO

4.1 OTIMIZAÇÃO

Otimizou-se as variáveis do processo de preparo de amostra a fim de extrair os melhores resultados analíticos possíveis, garantir a reprodutibilidade do procedimento e diminuir o consumo de reagentes e outros materiais, assim como, diminuir a produção de resíduos. Utilizou-se para a otimização o *software Statsoft Statistica 10* (Statsoft, EUA) e o programa *Microsoft Excel 2016* (Microsoft, EUA).

Inicialmente foi otimizada a relação de diluição água:mel para diminuir a interferência da matriz complexa. Utilizou-se um planejamento univariado que avaliou três níveis de diluição, sendo eles 4, 6 e 9 vezes. Foi considerada a média geométrica das áreas dos picos cromatográficos obtidas nas análises. A diluição de 6 vezes teve melhor desempenho para dois dos analitos, portanto foi a escolhida (**Figura 5**).

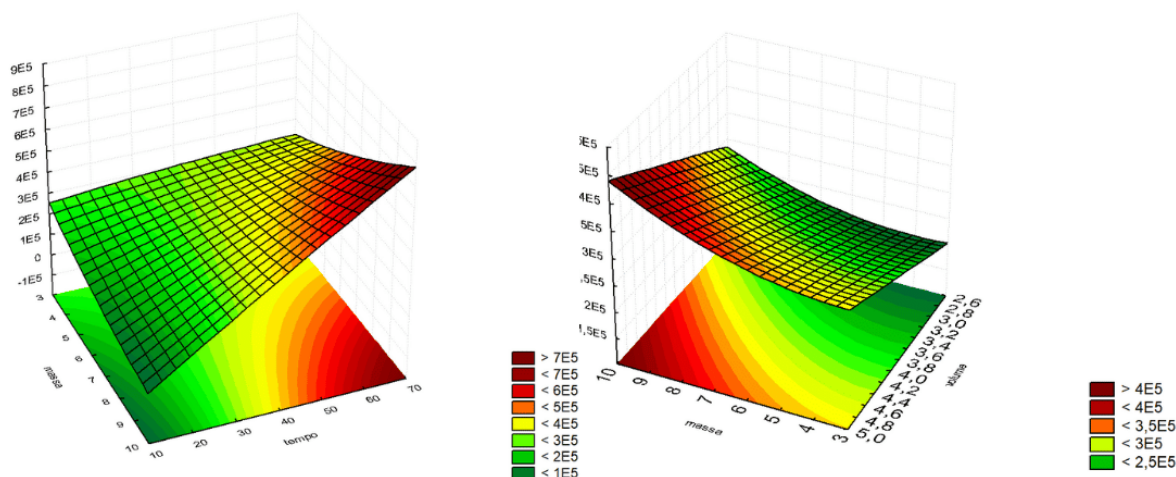
Figura 5. Otimização da diluição da amostra.



Fonte: *Microsoft Excel 2016 (Microsoft, EUA)*.

Posteriormente foi realizada a otimização para definir o volume de amostra, a massa de MDES e o tempo de extração através de um planejamento composto central. Nesta otimização foram realizadas 17 extrações e as áreas dos picos cromatográficos foram utilizadas para gerar o modelo estatístico. As superfícies de resposta obtidas (**Figura 3**) demonstraram que quanto maior o volume de amostra, a massa de MDES e o tempo de extração melhores os resultados analíticos (**Figura 6**). Considerando os resultados obtidos e as limitações experimentais referentes ao tamanho dos frascos comportados no sistema adaptado semiautomatizado de placa de 96 poços e ao diâmetro dos ímãs, definiu-se volume de amostra diluída de 4,5 mL, massa de MDES de 10 mg e o tempo de extração de 55 minutos.

Figura 6. Superfícies de resposta obtidas para otimização das condições de extração.



Fonte: *Software Statsoft Statistica 10* (Statsoft, EUA).

4.2 VALIDAÇÃO

A validação foi realizada utilizando mel em branco, obtido de um supermercado, fortificado com concentrações conhecidas dos analitos. As curvas de calibração de cada composto foram realizadas utilizando cinco concentrações (15, 30, 50, 100 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$), todas as análises foram feitas em triplicata no mesmo dia. Após a validação, aplicou-se a metodologia em quatro amostras de mel obtidas de pequenos produtores no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

4.3 MÉTRICA DE SUSTENTABILIDADE

A sustentabilidade da metodologia foi avaliada utilizando a métrica SPMS, que avalia as etapas e os processos envolvidos no preparo de amostra, de modo a avaliar o quão “verde” a metodologia é. De acordo com a pontuação e as cores obtidas para cada um dos parâmetros avaliados pela métrica, o estudo obteve resultados satisfatórios, principalmente com relação ao volume da amostra, ao volume do solvente, ao número de etapas de extração e ao volume de resíduos. Outro ponto notável é a execução de até seis extrações simultâneas usando o sistema adaptado semiautomatizado de placa de 96 poços. Enquanto o pior resultado ainda assim fica no limite tolerável, representado pela coloração alaranjada, sendo ele o solvente alternativo persistente. Contudo, vale ressaltar que o solvente, embora seja considerado persistente devido à presença do componente magnético, a massa utilizada de

apenas 10 mg é inteiramente injetada no analisador, gerando um volume de descarte irrisório, quando comparado com outras metodologias que utilizam solventes convencionais.

5. CONCLUSÃO

Foi desenvolvida e otimizada uma metodologia analítica verde, baseada em microextração em gota única utilizando um solvente eutético profundo magnético (MDES) para a determinação de Fipronil e dois de seus produtos de degradação, Fipronil dessulfinil e Fipronil sulfeto em amostras de mel. A metodologia possui um procedimento operacional simplificado, com poucas etapas em seu processo. Ela também apresenta reduzido uso de solvente e baixa geração de resíduos, além de não utilizar outros tipos de reagentes e possuir a capacidade de realizar múltiplas extrações simultaneamente. Essa metodologia tem potencial de substituir metodologias que utilizam solventes orgânicos tóxicos no preparo de amostras para análises toxicológicas em matrizes complexas diversificadas, assim como ambientais e de alimentos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Brasil. (2023). Lei nº 14.785, de 27 de Dezembro de 2023. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem, a rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e das embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, de produtos de controle ambiental, de seus produtos técnicos e afins; revoga as Leis nºs 7.802, de 11 de julho de 1989, e 9.974, de 6 de junho de 2000, e partes de anexos das Leis nºs 6.938, de 31 de agosto de 1981, e 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2023-2026/2023/Lei/L14785.htm#art65
- [2] Brasil. (2002). Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 8 jan. 2002. Recuperado de https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm

- [3] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2020). Registro de agrotóxicos. Recuperado em 28 de agosto de 2024, de <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoinformacao/perguntasfrequentes/agrotoxicos/registro-de-agrotoxicos>
- [4] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2019). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 294, de 29 de julho de 2019. Recuperado em 28 de agosto de 2024, de https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2019/rdc0294_29_07_2019.pdf
- [5] Ministério da Agricultura e Pecuária. (2019). Anvisa vai reclassificar todos os agrotóxicos que estão no mercado. Recuperado em 28 de agosto de 2024, de <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/anvisa-vai-reclassificar-todos-os-agrotoxicos-que-estao-no-mercado>
- [6] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2020). Reavaliação de agrotóxicos. Recuperado em 28 de agosto de 2024, de <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoinformacao/perguntasfrequentes/agrotoxicos/reavaliacao-de-agrotoxicos-2/reavaliacao-de-agrotoxicos>
- [7] Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. (2022). Avaliação ambiental para registro de agrotóxicos, seus componentes e afins de uso agrícola. Recuperado em 28 de agosto de 2024, de <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/avaliacao-ambiental>
- [8] Gonçalves, S., Vasconcelos, M. W., Mota, T. F. M., Lopes, J. M. H., Guimaraes, L. J., Miglioranza, K. S. B., & Ghisi, N. de C. (2022). Identifying global trends and gaps in research on pesticide fipronil: A scientometric review. *Environmental Science and Pollution Research*, 29, 79111-79125. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21135-8>
- [9] Torres, J. B., Rolim, G. G., Potin, D. M., Arruda, L. S., & Neves, R. C. S. (2021). Susceptibility of Boll Weevil (Coleoptera: Curculionidae) to Ethiprole, Differential Toxicity Against Selected Natural Enemies, and Diagnostic Concentrations for Resistance Monitoring. *Journal of Economic Entomology*, 114(6), 2381-2389. <https://doi.org/10.1093/jee/toab185>
- [10] Nortox. (2023). Fipronil Nortox 800 WG - Bula. Recuperado de https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2023-05/fipronilnortox800wg.pdf
- [11] Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. (2019). Perfil Ambiental - Fipronil. Recuperado de https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/arquivos/perfis-ambientais/2019/Perfil%20Ambiental%20-%20Fipronil%20-%202002_10_2019.pdf
- [12] Gunasekara, A. S., Truong, T., Goh, K. S., Spurlock, F., & Tjeerdema, R. S. (2007). Environmental fate and toxicology of fipronil. *Journal of Pesticide Science*, 32(3), 189-199. <https://doi.org/10.1584/jpestics.R07-02>
- [13] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2000). Instrução Normativa Mapa n° 11, de 20 de outubro de 2000 - Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. Gabinete do Ministro.
- [14] European Parliament and Council of the European Union. (2014). Directive 2014/63/EU of the European Parliament and of the Council of 15 May 2014 amending

Council Directive 2001/110/EC relating to honey. Official Journal of the European Union, L 164, 1-5.

[15] Silva, C. V. (2013). Características físico-químicas de mel de capixingui e silvestre da região de Ortigueira-PR. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Disponível em <https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/12433>

[16] Crane, E. (1975). Honey: A comprehensive survey (1th ed.). Eva Crane. Composition of honey (pp. 157-194). Bee Research Association.

[17] Kerkich, K., Bouargane, B., El Laghdach, A., Souhail, B., & Kadmi, Y. (2024). Recent advances in the extraction, purification and analysis of emerging pesticides in honey products: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 105947. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105947>

[18] Souza Tette, P. A., Rocha Guidi, L., de Abreu Glória, M. B., & Fernandes, C. (2016). Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. *Talanta*, 149, 124-141. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.11.045>

[19] Anastas, P. T., & Eghbali, N. (2010). Green chemistry: Principles and practice. *Chemical Society Reviews*, 39(1), 301-312. <https://doi.org/10.1039/B918763B>

[20] Gałuszka, A., Migaszewski, Z. M., & Namieśnik, J. (2013). The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 50, 78-84. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>

[21] Chen, Y., Guo, Z., Wang, X., & Qiu, C. (2008). Sample preparation. *Journal of Chromatography A*, 1184(1-2), 191-219. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.026>

[22] Burato, J. S. da S., Medina, D. A. V., Toffoli, A. L. de, Maciel, E. V. S., & Lanças, F. M. (2020). Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques. *Journal of Separation Science*, 43(1), 202-225. <https://doi.org/10.1002/jssc.201900776>

[23] Płotka-Wasyłka, J., Fabjanowicz, M., Kalinowska, K., & Namieśnik, J. (2020). Green chromatography: State-of-the-art, opportunities and future perspectives. In *Challenges in Green Analytical Chemistry* (pp. 255-278). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781788016148-00255>

[24] Xu, L., Basheer, C., & Lee, H. K. (2007). Developments in single-drop microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1152(1-2), 184-192. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.073>

[25] Liu, S., & Dasgupta, P. K. (1995). Liquid droplet. A renewable gas sampling interface. *Analytical Chemistry*, 67(13), 2042-2049. <https://doi.org/ez41.periodicos.capes.gov.br/10.1021/ac00109a023>

[26] Jeannot, M. A., Przyjazny, A., & Kokosa, J. M. (2010). Single drop microextraction—development, applications and future trends. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2326-2336. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.10.089>

[27] Xu, L., Basheer, C., & Lee, H. K. (2007). Developments in single-drop microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1152(1-2), 184-192. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.073>

- [28] Wagare, D. S., Shirsath, S. E., Shaikh, M., & Netankar, P. (2021). Sustainable solvents in chemical synthesis: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(4), 3263-3282. <https://doi-org.ez41.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10311-020-01176-6>
- [29] de Andrade, D. C., Monteiro, S. A., & Merib, J. (2022). A review on recent applications of deep eutectic solvents in microextraction techniques for the analysis of biological matrices. *Advances in Sample Preparation*, 1, 100007. <https://doi.org/10.1016/j.sampre.2022.100007>
- [30] Makoś-Chełstowska, P., Kaykhaii, M., Płotka-Wasyłka, J., & de la Guardia, M. (2022). Magnetic deep eutectic solvents—Fundamentals and applications. *Journal of Molecular Liquids*, 365, 120158. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.120158>
- [31] González-Martín, R., Gutiérrez-Serpa, A., Pino, V., & Sajid, M. (2023). A tool to assess analytical sample preparation procedures: Sample preparation metric of sustainability. *Journal of Chromatography A*, 1707, 464291. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464291>

ANEXO - CURRÍCULO LATTES



Alice Cristina Bastos de Souza

Endereço para acessar este CV: <https://lattes.cnpq.br/7652526672171887>

Última atualização do currículo em 05/09/2024

Possui graduação em Toxicologia Analítica pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Biociências pela UFCSPA, na área de toxicologia e preparo de amostras. Membro do Grupo de Estudos em Preparo de Amostras e Cromatografia (GEPAC). Possui experiência em análises toxicológicas. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Alice Cristina Bastos de Souza
Filiação	Eloisa Reis Bastos e Raul Correa de Souza
Nascimento	11/06/1997 - Brasil
Nome em citações bibliográficas	SOUZA, A. C. B.
Endereço eletrônico	E-mail para contato : alicecbs@ufcspa.edu.br E-mail alternativo : alice.c.souza@hotmail.com
Lattes ID	 7652526672171887
Orcid ID	 https://orcid.org/0000-0003-3256-0603

Formação acadêmica/titulação

- 2022** Mestrado em PPG Biociências.
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
Título: Determinação de agrotóxicos em mel utilizando solventes eutéticos profundos
Orientador: Josias de Oliveira Merib
Co-orientador: Eliane Dallegrave
- 2018 - 2022** Graduação em Toxicologia Analítica.
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
- 2021** Ensino Profissional de nível técnico em Curso Técnico em Celulose e Papel.
Instituto Estadual de Educação Gomes Jardim, IEEGJ, Brasil

Atuação profissional

Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA

2021 - 2022 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Parcial

2021 - 2022 Desenvolvimento de metodologias analíticas para avaliação do perfil neuroquímico em humor vítreo de ratos wistar por espectrometria de massas

Descrição: Os problemas de saúde e sociais associados ao consumo de substâncias psicoativas variam amplamente em todo o mundo, entretanto, correlações significativas com doença, incapacidade e morte podem ser evidenciadas na maioria das populações que as consomem. Dentre os diversos tipos de ocorrências relacionados ao uso de drogas de abuso, a dependência tem destaque. Embora os estudos sobre dependência de drogas tenham sido conduzidos e revisados por muitos anos, os mecanismos referentes a essa patologia ainda não estão claros. Com o desenvolvimento da pesquisa “omics”, os estudos de dependência com base em abordagens proteômicas e/ou metabolômicas cresceram substancialmente. Neste contexto, os neurotransmissores (NTs) tornaram-se biomarcadores diagnósticos e prognósticos, clinicamente relevantes para detectar vários distúrbios e para monitorar a eficácia da terapia, principalmente relacionados à função do sistema nervoso central, além de auxiliar no mapeamento de alterações metabólicas nas vias pode melhorar nosso conhecimento da etiologia subjacente do perfil de dependência de drogas. Diante do contexto, o objetivo do projeto é desenvolver métodos bioanalíticos para a determinação de NTs em humor vítreo utilizando a espectrometria de massas. O desenvolvimento tecnológico adquirido poderá ser facilmente aplicado a outros projetos de pesquisa, contribuindo assim, para avanços importantes no que concerne às implicações da toxicologia analítica à neurociência e à saúde pública.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Doutorado (1);

Integrantes: Alice Cristina Bastos de Souza (Responsável); ; Eliane Dallegrave; Sarah Eller.

2019 - 2021 Programa de Extensão Cuidando da Farmácia Caseira

Descrição: Farmácias Caseiras podem estar relacionadas ao uso irracional de medicamentos, influenciando hábitos de consumo dos usuários, favorecendo a automedicação e a reutilização de prescrições. A maioria das farmácias caseiras é guardada em locais inadequados. Medicamentos com o prazo de validade expirado devem ser descartados e inutilizados corretamente para evitar a contaminação do meio ambiente, intoxicações, uso sem necessidade, reações adversas e ineficácia do tratamento. Além disso, muitas famílias utilizam plantas medicinais na forma de chás e outras preparações, e sua utilização necessita de cuidados especiais quanto ao uso, manejo e ocorrência de efeitos adversos e interações medicamentosas. Este programa de extensão tem por objetivo promover o uso racional, guarda e descarte adequado de medicamentos, e o uso correto e seguro de plantas medicinais entre os usuários e equipes de Unidades de Saúde (USs) da zona norte de Porto Alegre e comunidade interna da UFCSPA. Através do programa são realizadas ações educativas para os usuários, e ações de formação continuada para as equipes das USs sobre os temas abordados pelo programa. Nas USs também são realizadas, para os usuários, campanhas de recolhimento de medicamentos vencidos, além de orientações sobre a guarda e descarte correto de medicamentos. Também estão previstas ações educativas, para os alunos de graduação da UFCSPA, que contribuam com a formação de profissionais de saúde quanto ao manejo da farmácia caseira e uso correto e seguro de plantas medicinais. Acredita-se que as ações desenvolvidas promovam o uso mais racional de medicamentos e de plantas medicinais

nas comunidades de abrangência do programa.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Alunos envolvidos: Graduação (10);

Integrantes: Alice Cristina Bastos de Souza; Kellen Cristhinia Borges de Souza (Responsável); Marta Quintanilha Gomes; Aline Lins Camargo

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Farmacologia
2. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia
3. Grande área: Ciências Exatas e da Terra / Área: Química
4. Grande área: Ciências Exatas e da Terra / Área: Química

Idiomas

Inglês Compreende Razoavelmente , Fala Pouco , Escreve Pouco , Lê Razoavelmente

Produção

Produção bibliográfica

Livros publicados

1. VIGNOLI-SILVA, M.; **SOUZA, A. C. B.**; GOULART, A. S.. Plantas tóxicas em nossas casas, nas escolas e nas ruas, ed.1. Porto Alegre: Editora da UFCSPA, 2021, v.1., p.54.

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital, ISBN: 9786587950433, Home page: https://www.ufcspa.edu.br/editora_log/download.php?cod=034&tipo=pdf

Apresentação de trabalho e palestra

1. **SOUZA, A. C. B.**; Merib, J. O.. DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM MEL USANDO SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO MAGNÉTICO, 2023. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Agrotóxicos, Mel, Solvente eutético profundo magnético

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários; Local: UFCSPA; Cidade: Porto Alegre; Evento: Ciência para um mundo em movimento; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

2. **SOUZA, A. C. B.**; DALLEGRAVE, E.; ELLER, S.; GOULART, A. S.. Desenvolvimento de metodo para revisão de literatura: Utilização de base de dados para seleção e organização de artigos, 2021.

(Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: Online; Cidade: Porto Alegre; Evento: Conectando Experiências em Saúde Global; Inst.promotora/financiadora: Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

3. **SOUZA, A. C. B.**. Oficina 3: Cuidados com os medicamentos no domicílio, 2021. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: Online; Cidade: Porto Alegre; Evento: 1º Congresso Estadual Sobre Uso Racional de Medicamento; Inst.promotora/financiadora: Departamento de Assistência Farmacêutica da Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul

4. **SOUZA, A. C. B.**; BELLEBONI, G. M.; SOUZA, K. C. B.; CAMARGO, A. L.; GOMES, M. Q.; CORREA, J. M. A.. Redes Sociais como Ferramenta Extensionista Durante a Pandemia de COVID-19, 2021. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio magnético; Local: Online; Evento: 9º CBEU- Congresso Brasileiro de Extensão Universitária: Redes para Promover e Defender os Direitos Humanos; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de Alfenas

5. **SOUZA, A. C. B.**; CORREA, J. M. A.; CAMARGO, A. L.; BELLEBONI, G. M.; SIVIERO, V. S.. Cuidando da Farmácia Caseira na Casa de Apoio Madre Ana, 2020. (Seminário,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Local: Online; Cidade: Londrina; Evento: 38º SEURS - Seminário de Extensão Universitária da Região Sul; Inst.promotora/financiadora: Universidade Estadual de Londrina

6. **SOUZA, A. C. B.**; SANTOS, A.; SOUZA, K. C. B.; GOMES, M. Q.. Descarte Adequado de Medicamentos: Uma responsabilidade compartilhada, 2019. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Local: Universidade; Cidade: Porto Alegre; Evento: Conectando Saúde e Sociedade; Inst.promotora/financiadora: Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. **1ª Feira de Saúde Virtual da UFCSPA, 2021.** (Feira) Peçonhentos kids.
2. **1ª Feira de Saúde Virtual da UFCSPA, 2021.** (Feira) Plantas Tóxicas no Meio Urbano.
3. **20 de Agosto- Dia Estadual de Prevenção a Acidentes Tóxicos-**, 2021. (Outra) Perfil das Ocorrências e Mudanças com a Pandemia da Covid-19.
4. **Curso Saúde Coletiva e Periferias, 2021.** (Outra) .
5. **SIBRAT- Simpósio Brasileiro de Análises Toxicológicas, 2021.** (Simpósio) .
6. **38º SEURS- Seminário de Extensão Universitária da Região Sul, 2020.** (Seminário) .
7. **Congresso UFCSPA: conectando saúde e sociedade, 2019.** (Congresso) .
8. **Uso Racional de Medicamentos: Discutindo o uso de antimicrobianos, 2019.** (Simpósio) .

9. **QUIMTOX**, 2018. (Simpósio) .

Organização de evento

1. CAMARGO, A. L.; SOUZA, K. C. B.; GOMES, M. Q.; **SOUZA, A. C. B.**. Uso Racional de Medicamentos e Medicalização da Saúde Mental na Pandemia, 2021. (Outro, Organização de evento)

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

2. DALLEGRAVE, E.; **SOUZA, A. C. B.**; GOULART, A. S.; ANDRADE, D. C.; MARASCA, A.; OLIVEIRA, A.; RAMIRES, E.; NEVES, J. V. B.. 1º Feira de Saúde virtual da UFCSPA, 2021. (Feira, Organização de evento)

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital