

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LISSARA APARECIDA DE SOUZA FREITAS

**MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MOLECULARMENTE IMPRESSA DE
TRIAZÓIS EM AMOSTRAS DE ÁGUA E SUCO DE UVA SEGUIDO DE ANÁLISE
POR GC-MS**

Alfenas-MG
2014

LISSARA APARECIDA DE SOUZA FREITAS

**MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MOLECULARMENTE IMPRESSA DE
TRIAZÓIS EM AMOSTRAS DE ÁGUA E SUCO DE UVA SEGUIDO DE ANÁLISE
POR GC-MS**

Exame de Defesa apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Química Analítica
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo.

Alfenas-MG
2014

Freitas, Lissara Aparecida de Souza.

Microextração em fase sólida molecularmente impressa de triazóis em amostras de água e suco de uva seguido de análise por GC-MS / Lissara Aparecida de Souza Freitas. - Alfenas, 2014.

81 f. -

Orientador: Eduardo Costa de Figueiredo.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Microextração em Fase Sólida. 2. Impressão Molecular. 3. Triazóis. 4. Água. 5. Sucos. I. Figueiredo, Eduardo Costa de. II. Título.

CDD: 543.85

LISSARA APARECIDA DE SOUZA FREITAS

**MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MOLECULARMENTE IMPRESSA DE
TRIAZÓIS EM AMOSTRAS DE ÁGUA E SUCO DE UVA SEGUIDO DE ANÁLISE
POR GC-MS**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Defesa de Mestrado apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais. Área de concentração: Química Analítica.

Aprovada em: 24 / 03 / 2024

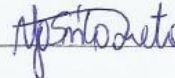
Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo
Instituição: Universidade Federal de
Alfenas (UNIFAL-MG)

Assinatura:



Prof. Dr. Álvaro Santos Neto
Instituição: Universidade de São Paulo (USP)

Assinatura:



Profa. Dr. Pedro Orival Luccas
Instituição: Universidade Federal de
Alfenas (UNIFAL-MG)

Assinatura:



Dedico á Deus e aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por ter me permitido alcançar mais uma etapa em minha vida;

Aos meus pais por estarem sempre ao meu lado dando força e apoio;

Ao meu namorado pela parceria, amizade e companheirismo e por sempre me apoiar;

As minhas queridas amigas e companheiras de graduação e pós- graduação Bia, Carla, Gabi e Karina pelas alegrias proporcionadas, pelo companheirismo, pela força, pela gratidão e pela amizade;

Ao meu orientador Eduardo Costa de Figueiredo, pela paciência, pela sabedoria e pelos ensinamentos durante os 2 anos de mestrado;

Aos amigos e funcionários do LATF- pela convivência agradável e divertida;

A querida amiga Paty, por sempre ser tão disponível aos alunos do LATF;

As amigas Lailah e Mariane que tornaram o início desta caminhada mais fácil e alegre.

Obrigada pelos ensinamentos meninas;

As Profs. Isarita e Vanessa;

A FAPEMIG.

A Unifal – MG.

Muito Obrigada!!

Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas.
Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para
achar as que estão certas.

Carl Sagan.

RESUMO

O uso de praguicidas na agricultura é uma das maiores fontes de contaminação ambiental, uma vez que tais compostos são lixiviados e disseminados em águas superficiais, subterrâneas e no solo, tornando-se um problema para a fauna, flora e para a saúde humana. Além disso, resíduos de praguicidas muitas vezes são encontrados em alimentos devido à utilização inadequada em super dosagens. Nesse sentido, faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas analíticas de preparo de amostras apropriadas para a extração e pré-concentração desses praguicidas nos recursos hídricos e em alimentos. Dentre essas técnicas podemos destacar a microextração em fase sólida molecularmente impressa (MISPME) devido a características vantajosas como seletividade, menor consumo de solventes orgânicos, tempo reduzido de extração, baixo custo para a construção da fibra, dentre outras. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo sintetizar e caracterizar uma fibra para MISPME com superfície renovável para a extração de triazóis em amostras de água e de suco de uva seguido de análise por CG-MS. De acordo com Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) os limites máximos de resíduo (LMR) para triadimenol, tebuconazol e metconazol em uva são respectivamente de 0,1, 2,0, e 1,0 mg kg⁻¹. E o limite máximo de tolerância (LMT) de triazóis em água, estabelecido por órgãos internacionais, é de 0,1 µg L⁻¹ para cada praguicida e de 0,5 µg L⁻¹ para um total deles. O epoxiconazol foi selecionado como padrão interno por ser proibido na cultura de uva. Para a análise em suco de uva, a faixa analítica do método compreende de 100 µg L⁻¹ a 2000 µg L⁻¹ para triadimenol, tebuconazol e metconazol, com LQ de 100 µg L⁻¹ para todos os analitos. Para análise em água, a faixa analítica do método compreende de 100 µg L⁻¹ a 3000 µg L⁻¹, com LQ de 100 µg L⁻¹. O método proposto para análise de triazóis em suco de uva atendeu todas as especificações requeridas em termos de figuras de mérito. Contudo, a detectabilidade do método foi insuficiente para análises de triazóis em águas devido aos baixos limites preconizados pela legislação (0,5 µg L⁻¹).

Palavras chaves: Microextração em fase sólida molecularmente impressa. Triazóis. Água. Suco de uva.

ABSTRACT

The use of pesticides in agriculture is a major source of environmental contamination since such compounds are leached and disseminated in surface water, groundwater and soil water, making it a problem for fauna, flora and human health. Moreover, pesticide residues are frequently found in food due to their uncontrolled use. Thus, it is necessary to develop analytical techniques of sample preparing for both pesticide extraction and concentration in water resources as well as food. Among these techniques, we can highlight the molecularly imprinted solid phase micro extraction (MISPME), due to its particular advantages as high selectivity, low organic solvent consumption, low extraction time, low cost of fiber fabrication, among others. Therefore, the present study's aim is to synthesize and characterize a new fiber for MISPME to extract triazoles from environmental and food samples followed by GC/MS analysis. According to MAPA (Ministry of Agriculture and Livestock) MRLs for grape triadimenol, tebuconazole, epoxiconazol and metconazole are respectively 0.1 mg kg^{-1} , 2 mg kg^{-1} prohibited to grape culture and 1 mg kg^{-1} . Knowing that epoxiconazole is prohibited to grape culture, it was selected as internal standard. The tolerance limit in water is established by international organizations, such as tolerance embrace a concentration of 0.1 mg L^{-1} for each pesticide and $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ for a total of them. For grape juice analysis, the analytical range of the method comprises from $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ to $2000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ to triadimenol, tebuconazole and metconazole, with LQ of $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. For water analysis, the analytical range of the method comprises from $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ to $3000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, with LQ of $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. The proposed method for triazole analyses in grape juice met all required specifications being applied with confidence. However, the detectability of the method was insufficient for the analyses of triazoles in water samples due to the low tolerance limits.

Keywords: Microextraction molecularly imprinted solid phase. Triazoles. Water. Grape juice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Microextração em fase sólida pelo método: (A) Direto; (B) Headspace; (C) Direto com membrana.....	26
Figura 2 -	Esquema genérico da síntese de MIP.....	32
Figura 3 -	Esquema de síntese das fibras MISPME: (a) Revestimento de um suporte sólido, (b) Síntese na forma de monólito.....	37
Figura 4 -	Processo de síntese da fibra de MISPME.....	47
Figura 5 -	Fibra de MIP ou NIP (1) acoplado ao <i>holder</i> (2).....	49
Figura 6 -	Fibra de MISPME não tensionada (a) e tensionada em ângulo de 50° (b).....	52
Figura 7 -	Microscopia eletrônica de varredura da fibra de MISPME: (a) micrografia da parte externa da fibra e (b) micrografia da parte interna da fibra, mostrando a alta porosidade apresentada pela fibra.....	53
Figura 8 -	Estudo termogravimétrico de uma fibra de MISPME de 25 a 400°C com uma rampa de aquecimento de 10° C.....	54
Figura 9 -	Estudo da perda de massa da fibra de MISPME após 20 dessorções consecutivas de 1 min no injetor de um cromatógrafo a gás a 300°C.....	55
Figura 10 -	Hipótese para superfície renovável da fibra de MISPME.....	56
Figura 11 -	Scan da fibra de MISPME nas temperaturas de 200°C e 300°C por 60 min.....	57
Figura 12 -	Espectro de Infravermelho para (a) uma fibra nova de SPME sem aquecimento (b) e uma fibra aquecida no interior de <i>liner</i> de um cromatógrafo a gás durante 10 min a 300°C.....	58
Figura 13 -	Estrutura química dos reagentes de síntese das fibras de MISPME (a) MAA, (b) EGDMA, (c) AIBN.....	59
Figura 14 -	Estudo de comparação da extração entre MIP, NIP e fibra comercial.....	59
Figura 15 -	Influência da temperatura na resposta analítica (Solução aquosa na concentração de 1 mg L ⁻¹) n=3.....	61
Figura 16 -	Influência da velocidade de agitação na resposta analítica (Solução aquosa na concentração de 1 mg L ⁻¹) n=3.....	62
Figura 17 -	Influência da adição de sal na resposta analítica (Solução aquosa na concentração de 1 mg L ⁻¹) n=3.....	63

Figura 18 -	Influência do tempo de extração na resposta analítica (Solução aquosa na concentração de 1 mg L^{-1} $n=3$	64
Figura 19 -	Cromatograma da fibra de MISPME obtido antes das extrações das amostras....	66
Figura 20 -	Cromatograma de uma amostra de água fortificada com os analitos triadimenol, tebuconazol, e metconazol na concentração de $1000\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ e epoxiconazol (PI) na concentração de $500\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$	66
Figura 21 -	Cromatograma da fibra de MISPME extraindo os analitos triadimenol $100\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, tebuconazol $100\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, epoxiconazol $500\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ (PI) e metconazol $100\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ em amostra de suco de uva (nível do LQ).....	69
Figura 22 -	Cromatograma de fibra de MISPME extraindo os analitos triadimenol, tebuconazol, metconazol na concentração de $1000\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ e epoxiconazol (PI) na concentração $500\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ em amostra de suco de uva.....	70
Figura 23 -	Cromatograma de uma amostra real de suco de uva (triadimenol - 4,42 min, tebuconazol - 5,32 min, epoxiconazol - 5,41 min e metconazol - 5,77 min).....	74
Figura 24 -	Cromatograma de uma amostra real de água (triadimenol - 4,42 min, tebuconazol - 5,32 min, epoxiconazol - 5,41 min e metconazol - 5,77 min)....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Fibras de SPME comercialmente disponíveis.....	27
Tabela 2 –	Ajuste dos dados para amostra de água utilizando a MISPME.....	65
Tabela 3 –	Estudo de LQ e LD para amostra de água utilizando a MISPME.....	67
Tabela 4 –	Precisão e exatidão para análise do triazol triadimenol em água por MISPME.....	67
Tabela 5 –	Precisão e exatidão para análise do triazol tebuconazol em água por MISPME.....	68
Tabela 6 –	Precisão e exatidão para análise do triazol metconazol em água por MISPME.....	68
Tabela 7 –	Ajuste dos dados para amostra de suco de uva utilizando a MISPME.....	70
Tabela 8 –	Estudo de LQ e LD para amostra de suco de uva utilizando a MISPME.....	71
Tabela 9 -	Precisão e exatidão para análise do triadimenol em suco de uva por MISPME.....	72
Tabela 10 -	Precisão e exatidão para análise do tebuconazol em suco de uva por MISPME.....	72
Tabela 11 -	Precisão e exatidão para análise do metconazol em suco de uva por MISPME.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	- Acrilamida
AIBN	- 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila
ALC	- Agente de ligação cruzada
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CA	- Ácido cafeico
CAPE	- Éster fenetílico do ácido cafeico
CONAMA	- Conselho Nacional do Meio-Ambiente
CE	- Comunidade Europeia
Cn	- Creatina
CRE	- Creatinina
CW	- Carbowax
DBP	- Dibutil ftalato
DVB	- Divinilbenzeno
DDT	- Dicloro difenil tricloroetano
EDMA	- Etileno dimetacrilato
EGDMA	- Etileno glicol dimetacrilato
FID	- Detector de ionização em chama
GC	- Cromatografia gasosa
HF-SPME	- Microextração em fase sólida em fibra oca
HPLC	- Cromatografia líquida de alta eficiência
HS-SPME	- <i>Headspace</i>
InR	- Iniciador radicalar
LC	- Cromatografia líquida

LD	- Limite de detecção
LLE	- Extração líquido-líquido
LMR	- Limite máximo de resíduo
LQ	- Limite de quantificação
L-Tyr	- l-tirosina
MSPD	- Extração em fase sólida dispersiva
MAA	- Ácido metacrílico
MAPA	- Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento
MBAAm	- N,N-metilenebisacrilamida
MF	- Monômero funcional
MIP	- Polímero de impressão molecular
MISPME	- Microextração em fase sólida molecularmente impressa
MLLE	- Extração líquido-líquido por membranas
MM	- Molécula modelo
MMA	- Ministério do Meio Ambiente
MS	- Espectrômetro de massas
NIP	- Polímero não impresso
OFL	- Ofloxacin
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PA	- Poliacrilato
PARA	- Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PDMS	- Polidimetilsiloxano
SBSE	- Extração por barra de agitação
SM2	- Sulfametazina
SPE	- Extração em fase sólida

SPME	- Microextração em fase sólida
TG	- Análise termogravimétrica
THF	- Tetrahidrofurano
TNT	- 2,4,6-Trinitrotolueno
TOXNET	- Toxicology Data Network
TRIM	- Trimetilopropano trimetacrilato
UE	- União Europeia
4 VP	- 4 -Vinil piridina
VTEOS	- Vinil tetraetoxissilano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	CONTAMINAÇÃO POR PRAGUICIDAS.....	19
2.2	LIMITES MÁXIMOS DE RESÍDUOS PERMITIDOS.....	20
2.3	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E TOXICOLÓGICAS DOS TRIAZÓIS.....	21
2.4	MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	24
2.5	POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS.....	30
2.6	MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MOLECULARMENTE IMPRESSA.....	36
2.7	CULTURA DE UVA.....	40
3	JUSTIFICATIVA.....	42
4	OBJETIVO.....	43
5	MATERIAL E MÉTODO.....	44
5.1	AMOSTRA.....	44
5.2	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	44
5.3	EQUIPAMENTOS.....	45
5.4	SÍNTESE DA FIBRA DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MOLECULARMENTE IMPRESSA.....	46
5.5	CARACTERIZAÇÃO.....	47
5.6	MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MOLECULARMENTE IMPRESSA (MISPME).....	48
5.7	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	49
5.8	VALIDAÇÃO.....	50
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51

6.1	SÍNTESE DA FIBRA DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MOLECULARMENTE IMPRESSA.....	51
6.2	CARACTERIZAÇÃO.....	52
6.2.1	Avaliação da Flexibilidade.....	52
6.2.2	Microscopia eletrônica de varredura.....	53
6.2.3	Análise Termogravimétrica (TG) e Estudo de Dessorção.....	54
6.2.4	Análises de infravermelho.....	57
6.2.5	Comparação NIP, MIP e fibra comercial.....	59
6.3	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO.....	60
6.3.1	Temperatura de extração.....	61
6.3.2	Velocidade de Agitação.....	62
6.3.3	Efeito <i>salting-out</i>.....	62
6.3.4	Tempo de extração.....	63
6.4	VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO.....	64
6.4.1	Amostra de água.....	65
6.4.1.1	Ajuste matemático dos dados.....	65
6.4.1.2	LQ e LD.....	67
6.4.1.3	Exatidão e Precisão.....	67
6.4.2	Amostra de Suco de uva.....	68
6.4.2.1	Ajuste matemático dos dados.....	68
6.4.2.2	LQ e LD.....	71
6.4.2.3	Exatidão e Precisão.....	72
6.5	ANÁLISE DAS AMOSTRAS REAIS.....	73
7	CONCLUSÃO.....	75
	REFERÊNCIAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

Os praguicidas são substâncias utilizadas no combate à diversas pragas e em uma variedade de plantações, como por exemplo, frutas e vegetais (HUANG; ZHOU; XIE, 2013). Seu emprego proporciona um maior rendimento e uma melhoria nas plantações. Porém, quando seu uso excede os limites de segurança, graves problemas diretos ou indiretos para o ser humano podem ocorrer (SKEVAS et al., 2012).

O uso de produtos químicos no combate as pragas tem sido mencionado a mais de 3000 anos em escrituras greco-romanas onde arsênio era utilizado como inseticidas. Há 2.000 anos, os chineses já usavam as flores de crisântemo também como inseticida, enquanto que as flores de piretro eram utilizadas pelos povos do deserto como repelente de moscas e mosquitos (ALVES FILHO, 2002).

No fim do século XX e início do século XXI, o uso de produtos químicos inorgânicos para a proteção de plantas contra pragas foi intensificado, dando início a *primeira geração* de praguicidas. A *segunda geração* teve início com a síntese do *lethane 384* em 1932, considerado o primeiro praguicida orgânico obtido em escala laboratorial. Contudo, o marco histórico da evolução dos praguicidas é definido a partir da síntese do DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano) por Otto Ziedler em 1874 (ALVES FILHO, 2002).

De acordo com Schreinemachers e Tipraqsa (2012) os países desenvolvidos utilizam uma quantidade maior de praguicidas nas lavouras do que os países em desenvolvimento. Porém, os problemas de contaminação são mais frequentes em países em desenvolvimento, principalmente pelo uso desinformado e em doses inapropriadas.

Os membros da União Europeia (UE) e da Comissão Europeia (CE) introduziram uma política de controle de praguicidas, sendo as diretivas 91/414/EC e 98/8/EC as primeiras que trataram da autorização dos praguicidas (SKEVAS et al., 2012). Essas diretivas têm como objetivo o controle dos níveis de resíduos dessas substâncias nos alimentos, assegurando a saúde do consumidor (NOUGADÈRE et al., 2011).

Com o avanço do comércio internacional, houve a necessidade de regulamentar a criação de novos praguicidas. Então, em 1989, o Congresso Nacional aprovou a “Lei dos agrotóxicos” que substituiu o Decreto 24.114 de 1934. Essa lei foi substituída pelo decreto 4074 de Janeiro de 2002, que se caracterizou pelo surgimento de regras mais rigorosas para o registro de praguicidas. A nova legislação fixava que o registro de novos praguicidas só iria ocorrer se eles apresentassem toxicidade igual ou menor em comparação a algum outro já

existente no mercado para o mesmo fim. Foi instituída também a obrigatoriedade de receituário agrônomo para a comercialização, além do estabelecimento de normas e padrões para o destino de suas embalagens dos mesmos (PELAEZ; TERRA; SILVA, 2010).

Nos últimos 7 anos, houve um aumento significativo no consumo de praguicidas em relação aos anos anteriores. No ano de 2011, foram transacionadas 826.683 t em produtos e 352.048 t de princípio ativo (FERREIRA; CAMARGO; VEGRO, 2012).

Com o alto consumo de praguicidas nas lavouras, é também alta a probabilidade de se encontrar alimentos contaminados, capazes de causar sérios danos à saúde do consumidor. Nesse sentido, é cada vez mais necessário o desenvolvimento de técnicas de preparo de amostras capazes de capturar seletivamente os analitos em detrimento dos concomitantes das amostras, concentrando-os a níveis detectáveis, de acordo com as técnicas analíticas empregadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONTAMINAÇÃO POR PRAGUICIDAS

A maior fonte de contaminação de alimentos, solos, águas e alteração no ecossistema é o uso indiscriminado de praguicidas. Devido a isso, resíduos desses compostos podem ser encontrados em diversas amostras, normalmente em níveis de concentração muito baixos, o que dificulta muito a análise química (MENEZES FILHO; SANTOS; PEREIRA, 2010).

No solo, os praguicidas podem se comportar de diferentes maneiras. Podem ser degradados por micro-organismos, sofrer degradação química, além de se volatilizarem ou serem diluídos pelo fluxo de água. A taxa de degradação do solo depende da quantidade de água disponível e da temperatura. Então, em solos secos, o tempo de meia-vida do praguicida normalmente é mais prolongado (WERF, 1996).

A contaminação das águas pode ocorrer por lixiviação ou escoamento. A lixiviação causa contaminação das águas subterrâneas, enquanto que o escoamento causa contaminação das águas superficiais. Praguicidas que se ligam fortemente ao solo são resistentes à volatilização e a degradação, além de escoarem menos, enquanto que aqueles de alta solubilidade em água tendem a se lixiviar mais facilmente (WERF, 1996).

Apesar da maioria dos praguicidas serem degradados no solo ou na atmosfera, alguns deles podem ser transferidos para o ser humano através da cadeia alimentar, sendo prejudiciais à saúde dos indivíduos (ZHANG, 2012). Os resíduos podem ser encontrados em produtos frescos ou industrializados (KEIKOTLHAILE, 2010). Alguns autores relatam que alimentos fritos, cozidos, lavados, assados e fervidos reduziram os níveis de praguicidas. Já os produtos que são concentrados ou pressionados (sucos e óleos vegetais de sementes, por exemplo) não procedem da mesma maneira, tendo então níveis mais altos dessas substâncias (KEIKOTLHAILE, 2010). Algumas agências regulatórias tem a função de fiscalizar a presença desses toxicantes em alimentos por meio de análises químicas e pela comparação das concentrações encontradas com o limite máximo de resíduo (LMR), também preconizado por essas agências (ZHANG, 2012).

2.2 LIMITES MÁXIMOS DE RESÍDUOS

Para garantir uma boa prática agrícola, o uso de praguicidas deve obedecer às normas sob qualquer fase da produção (armazenamento, transporte, etc). Outro parâmetro a ser seguido se refere à seleção do praguicida que será utilizado. Deve-se sempre escolher aquele que possui menor toxicidade dentre aqueles que podem ser utilizados em uma mesma cultura. Deve-se também respeitar o intervalo de pré-colheita, justamente para garantir que não há resíduos do praguicida no momento da colheita (ALMEIDA, 1982).

No Brasil, o registro de praguicidas é controlado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que tem a responsabilidade de regular o impacto dessas substâncias na saúde humana, além de estabelecer os LMR. Já os Ministérios do Meio Ambiente (MMA) e da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) avaliam o impacto não-humano, e a eficácia dos praguicidas em controlar as pragas, respectivamente (JARDIM; CALDAS, 2012).

O LMR é definido como quantidade máxima de um dado praguicida (mg Kg^{-1}) que pode ser encontrado em alimentos, água e rações de animais (DROGUÉ; DeMARIA, 2012). Os LMRs são determinados, no Brasil, a partir de ensaios supervisionados feitos em todo país. Em 2011, vários princípios ativos tiveram seus LMRs estabelecidos para uma variedade de alimentos no país (JARDIM; CALDAS, 2012).

De acordo com o MAPA, os LMRs para os praguicidas triadimenol, tebuconazol, e metconazol em amostras de uva são de 0,10, 2,0, 1,0 mg Kg^{-1} , respectivamente, enquanto que o epoxiconazol não é permitido para tal cultura .

Em 2010, através do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), a ANVISA coletou amostra - segundo o plano de amostragem definido pelo programa - em diversos estados brasileiros. Foram analisadas amostras de 18 alimentos (abacaxi, alface, arroz, batata, beterraba, cebola, cenoura, couve, feijão, laranja, maçã, mamão, manga, morango, pepino, pimentão, repolho e tomate) e a escolha foi baseada na disponibilidade destes em supermercados e no uso intensivo de praguicidas. Foram analisadas 2.488 amostras, das quais 37% não apresentaram nenhum tipo de resíduo; 35% apresentaram resíduos abaixo dos LMRs estabelecidos; e 28% foram consideradas insatisfatórias, pois apresentaram resíduos de produtos não autorizados ou, autorizados, mas acima dos LMRs (ANVISA, 2010).

A contaminação das águas também é um fator que está relacionado ao uso indiscriminado e desajustado de praguicidas, onde a persistência destes no meio ambiente

reflete na saúde dos seres humanos e dos animais. Pensando nisso, órgãos internacionais adotam como LMTs em águas a concentração de $0,1\mu\text{g L}^{-1}$ para cada praguicida e de $0,5\mu\text{g L}^{-1}$ para um total deles (DIRECTIVE 2006/118/EC).

No Brasil, o CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente - é o órgão responsável pela regulamentação, controle e manutenção da qualidade do meio ambiente, e não apresenta normas específicas para os analitos triazólicos em água (CONAMA, 2008).

2.3 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E TOXICOLÓGICAS DOS TRIAZÓIS

Sabendo-se da necessidade da utilização dos praguicidas nas plantações, e tendo em vista que todos os praguicidas são tóxicos para o homem, dependendo da dose, a OMS (Organização Mundial de Saúde) classificou os praguicidas de acordo com a toxicidade aguda, oral e dérmica utilizando ratos para este estudo. Assim, 48 deles foram classificados como extremamente perigosos (classe Ia), 77 como altamente perigosos (classe Ib), 141 moderadamente perigosos (classe II) e 153 como ligeiramente perigosos (classe III) (HE, 1993).

A toxicidade de um praguicida é dada normalmente por meio da dose ou concentração que causa um efeito deletério específico em 50% da população de estudo (EC_{50} ou ED_{50}). Quando esse efeito é a morte, o parâmetro empregado é a dose letal 50 (DL_{50}) ou a concentração letal 50 (CL_{50}). Estudos indicam que os praguicidas podem danificar o sistema imune agindo como os hormônios e interrompendo o sistema endócrino de humanos e animais. Há estimativas de que um milhão de pessoas a cada ano sofrem de intoxicações acidentais com praguicidas, e destes, cerca de 1 milhão e 20 mil vão a óbito (WERF, 1996).

Os fungicidas azólicos, moléculas alvo desse trabalho, possuem características comuns quando se trata de desregulação endócrina. Eles causam o aumento de gestação em fêmeas e o aumento dos níveis de hormônios esteróides no feto e/ou nas fêmeas, mostrando que o efeito de desregulação endócrina destes fungicidas é a perturbação de enzimas importantes, como CYP17 que está envolvida na síntese de hormônios esteróides (TAXVIG et al., 2007).

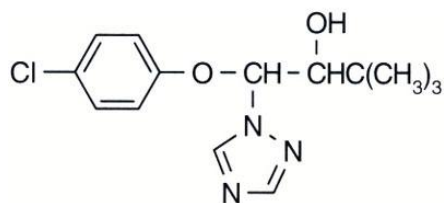
Estudos realizados em ratos com os praguicidas triazólicos epoxiconazol, mancozeb, procloraz, tebuconazol e procimidona, mostraram que houve aumento no tempo da gestação em fêmeas, retenção dos mamilos e malformação dos órgãos genitais dos machos quando se utilizou uma baixa dose de uma mistura dos cinco praguicidas. Esses desvios ocorridos nos

animais não foram verificados quando a mesma dose foi utilizada isoladamente, indicando que a mistura e o consumo acumulado provocam graves problemas de desenvolvimento e reprodução nos animais (HASS et al., 2012).

A ANVISA e TOXNET (Toxicology Data Network) especificam os praguicidas triazólicos triadimenol, epoxiconazol, tebuconazol e metconazol como demonstrado abaixo.

Triadimenol:

- ✓ Ingrediente ativo: TRIADIMENOL (triadimenol)
- ✓ Nome químico: (1RS,2RS;1RS,2SR)-1-(4-chlorophenoxy)-3,3-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-ol
- ✓ Fórmula bruta: $C_{14}H_{18}ClN_3O_2$
- ✓ Fórmula estrutural:

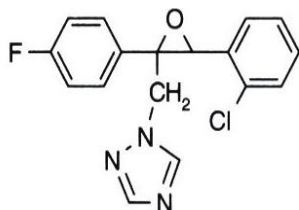


- ✓ Grupo químico: Triazol
- ✓ Classe: Fungicida
- ✓ Classificação toxicológica: Classe II
- ✓ Ingestão Diária Aceitável (IDA) = $0,05 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.c.}$
- ✓ Ponto de fusão: 124°C
- ✓ Solubilidade em água: 120 mg L^{-1}
- ✓ Pressão de vapor: $3,10 \text{ E}^{-10} \text{ mm Hg}$

Epoxiconazol:

- ✓ Ingrediente ativo: EPOXICONAZOL (epoxiconazole)
- ✓ Nome químico: (2RS,3SR)-1-[3-(2-chlorophenyl)-2,3-epoxy-2-(4 fluorophenyl)propyl]-1H-1,2,4- triazole
- ✓ Fórmula bruta: $C_{17}H_{13}ClFN_3O$

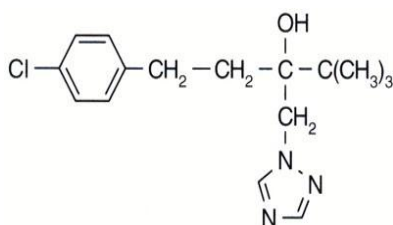
- ✓ Fórmula estrutural:



- ✓ Grupo químico: Triazol
- ✓ Classe: Fungicida
- ✓ Classificação toxicológica: Classe III
- ✓ Ingestão Diária Aceitável (IDA): $0,003 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.c.}$

Tebuconazol:

- ✓ Nome técnico: TEBUCONAZOL (tebuconazole)
- ✓ Nome químico: (RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol
- ✓ Fórmula bruta: $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{O}$
- ✓ Fórmula estrutural:

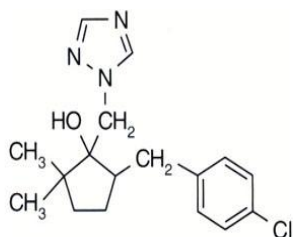


- ✓ Grupo químico: Triazol
- ✓ Classe: Fungicida
- ✓ Classificação toxicológica: Classe IV
- ✓ Ingestão Diária Aceitável (IDA) = $0,03 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.c.}$
- ✓ Ponto de fusão: $102,4 \text{ }^\circ\text{C}$
- ✓ Solubilidade em água: 36 mg L^{-1}
- ✓ Pressão de vapor: $1,28 \text{ E}^{-8} \text{ mm Hg}$

Metconazol:

- ✓ Ingrediente ativo: METCONAZOL (metconazole)

- ✓ Nome químico: (1RS, 5RS;1RS,5SR)-5-(4-chlorobenzyl)-2,2-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)cyclopentanol
- ✓ Fórmula bruta $C_{17}H_{22}ClN_3O$
- ✓ Fórmula estrutural:



- ✓ Grupo químico: triazol
- ✓ Classe: Fungicida
- ✓ Classificação Toxicológica: Classe I
- ✓ Ingestão Diária Aceitável (IDA) = $0,048 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.c.}$
- ✓ Ponto de fusão: $111,5^\circ\text{C}$
- ✓ Ponto de ebulição: 285°C
- ✓ Solubilidade em água: 15 mg L^{-1}
- ✓ Pressão de vapor: $9,23 \text{ E}^{-8} \text{ mm Hg}$

2.4 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

As amostras de água e de alimentos muitas vezes possuem traços residuais de praguicidas além de diversos contaminantes que podem interferir nas análises. Sendo assim, faz-se necessário o uso de técnicas de preparo de amostras para a pré-concentração e *clean up* dessas amostras. As técnicas mais tradicionais de preparo de amostras ambientais e de alimento são a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE).

A LLE é baseada na solubilidade do analito em duas fases imiscíveis e é governada pelo coeficiente de partição. A separação do analito é feita pela diferença de polaridade das duas fases imiscíveis (RIDGWAY; LALLJIE; SMITH, 2007). Atualmente, ela ainda é muito utilizada como uma técnica de pré-tratamento para separação e para pré-concentração de analitos. Porém, requer grandes quantidades de solventes, o que a torna cara, além de demorada e prejudicial ao meio ambiente (PEREIRA; LAVILLA; BENDICHO, 2009). Outro

fator a ser considerado é a formação de emulsões o que prejudica as análises (PEREIRA; LAVILLA; BENDICHO, 2009).

A SPE está relacionada com a sorção líquido-sólido onde a fase de extração é um sorvente sólido (RIDGWAY; LALLJIE; SMITH, 2007). Comparada com a extração líquido-líquido, ela tem a vantagem de utilizar uma quantidade 10 vezes menor de solventes orgânicos além de ser robusta e bem estabelecida (WANG; DU, 2010).

A SPE consiste basicamente de um cartucho de polipropileno e seu interior é preenchido com um sorvente sólido. Nesta técnica, os analitos contidos numa matriz aquosa são extraídos juntamente com os compostos interferentes após passarem por um sorvente. Um solvente orgânico seletivo é geralmente utilizado para remover os interferentes e então, outro solvente é usado para eluir os analitos de interesse (BARRIONUEVO; LANÇAS, 2001).

A necessidade de reduzir ainda mais a utilização de solventes orgânicos deu origem à técnica de microextração em fase sólida (SPME).

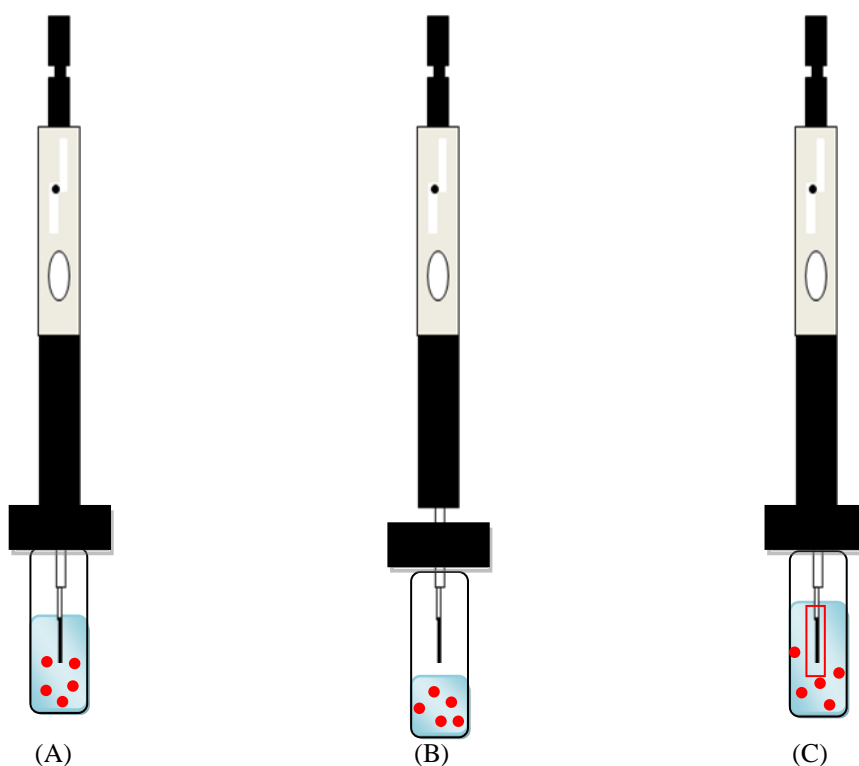
A SPME pode ser realizada de duas formas: utilizando tubos revestidos internamente com a fase estacionária (SPME em tubo), ou da maneira mais convencional utilizando fibras como material adsorvente.

A SPME em tubo foi desenvolvida como um processo automatizado de extração, dessorção e injeção a ser utilizada em cromatógrafos líquidos. Em um processo de extração por SPME em tubo, a amostra aquosa passa pelo interior do tubo, que é revestido com um sorvente sólido, e os analitos são retidos. Os sorventes podem revestir a parte interna do capilar, estar na forma de fibras, na forma empacotada e na forma de um monólito. A dessorção dos analitos é feita por um solvente. Esta técnica automatizada tem como vantagem não só a alta frequência analítica, mas também a melhor exatidão e precisão (KATAOKA; SAITO, 2011).

A SPME convencional consiste em uma fibra de sílica fundida (fase estacionária) onde os analitos, por afinidade, migram da matriz para a fibra, sendo então concentrados. Posteriormente, os analitos são termicamente dessorvidos no injetor do GC para análise (TAMAYO et al., 2007; DJOZAN, 2010). Comparada com as extrações convencionais, a SPME tem a vantagem de utilizar pequenas quantidades de solventes, ter boa sensibilidade e extrair analitos de baixo peso molecular (RIDGWAY; LALLJIE; SMITH, 2007). Como desvantagens da SPME, pode-se destacar a baixa disponibilidade de fibras específicas para cada tipo de analito a ser analisado (DJOZAN et al.;2010). Ela preserva as vantagens da SPE como baixo custo e seletividade, porém elimina as desvantagens como, por exemplo, o entupimento e o grande consumo de solventes (ZHANG; YANG; PAWLISZYN, 1994).

A SPME pode ser executada de 3 maneiras diferentes (Figura 1). A primeira maneira é a introdução direta da fibra na matriz (DI-SPME), e os analitos que tiverem afinidade pela fibra de SPME serão sorvidos e levados para posterior análise. A segunda maneira é a *headspace* (HS-SPME), em que a fibra de SPME fica na parte superior da amostra não entrando em contato com a matriz, e os analitos que tiverem afinidade pela fibra serão sorvidos e levados para posterior análise. Esta maneira de extração é normalmente utilizada para analitos voláteis já que a fibra de SPME fica em contato com a fase volatilizada dos analitos (PAWLISZYN, 2009). E a terceira maneira, é uma variação da DI-SPME onde se coloca uma membrana ao redor da fibra para impedir que partículas de grande peso molecular sejam aderidas à mesma. As partículas menores atravessam a membrana e aquelas que tiverem afinidade pela fibra de SPME serão sorvidas (PAWLISZYN, 2009).

Figura 3 - Microextração em fase sólida pelo método: (A) Direto; (B) Headspace; (C) Direto com membrana.



Fonte: Do autor

Um bom desempenho na SPME está diretamente ligado à capacidade de extração da fibra, a durabilidade e a reprodutibilidade entre as fibras. Elas normalmente podem ser usadas em uma vasta gama de aplicações: para analitos polares e não-polares e para analitos voláteis e não-voláteis (PAWLISZYN, 2009).

O recobrimento com o sorvente da fibra de SPME pode ser caracterizado quanto ao tipo, espessura, polaridade e quanto ao mecanismo de interação com o analito que pode ser partição ou adsorção (PAWLISZYN, 2009).

Na Tabela 1 estão apresentados alguns tipos de fibras disponíveis comercialmente.

Tabela 1- Fibras de SPME comercialmente disponíveis.

Tipo de recobrimento	Mecanismo de extração	Polaridade
PDMS	Absorvente	Apolar
Carbopack Z-PDMS	Adsorvente	Mista
DVB/Carboxen-PDMS	Adsorvente	Mista
PEG (carbowax)	Absorvente	Polar
PDMS-DVB	Adsorvente	Mista
Carboxen-PDMS	Adsorvente	Mista
PA	Absorvente	Polar

Fonte: PAWLISZYN, 2009.

Em processos de extração por SPME, a extração exaustiva não é alcançada, visto que opera em condições de equilíbrio ou próximas ao equilíbrio. Por não ser uma técnica exaustiva de extração, a SPME extrai somente de 2 a 20% de analitos. Porém todos os analitos retidos conseguem ser dessorvidos e analisados (WINEFORDNER, 2003).

A constante de distribuição entre a fibra de SPME e a matriz (K_{fs}) pode ser representada pela equação abaixo:

$$K_{fs} = \frac{C_f}{C_s}$$

em que, C_f é a concentração de analitos sorvidos na fibra e C_s é a concentração de analitos presente na matriz (WINEFORDNER, 2003).

A equação a seguir representa a condição de equilíbrio entre a fibra de SPME e a solução:

$$n = \frac{K_{fs} V_f V_s C_o}{K_{fs} V_f + V_s}$$

em que n corresponde ao número de mols de analitos sorvidos na fibra, K_{fs} é a constante de distribuição entre a fibra e a matriz, V_f é o volume da fibra, V_s é o volume da solução e C_o é a concentração inicial de analitos presente na matriz. Observando a equação, percebemos que, quando o volume da solução é muito alto ($K_{fs} V_f \ll V_s$), a parcela $K_{fs} V_f$ pode ser desprezada, resultando na equação abaixo:

$$n = K_{fs} V_f C_o$$

A partir desta conclusão temos que o número de mols sorvidos na fibra de SPME corresponde diretamente com a concentração de analitos presente na matriz, independentemente do volume da solução. E o aumento no tempo de extração não implicará no aumento do número de mols sorvidos pela fibra de SPME após o equilíbrio ser atingido (WINEFORDNER, 2003).

A SPME pode ser aplicada para variados tipos de amostras. Nesse contexto, Filho et al. (2010) utilizaram esta técnica para o monitoramento praguicidas em manga. Os autores utilizaram SPME como técnica de preparo de amostra para extração de 16 praguicidas (clofentezina, carbofuran, diazinona, metil parathion, malation, fention, tiabendazol, imazalil, bifentrin, permetrin, procloraz, piraclostrobin, difenoconazol e azoxistrobin). As análises foram realizadas por GC-MS. Os praguicidas estudados pertencem a diferentes classes químicas, o que levou os autores a investigar 5 fibras comerciais diferentes: uma fase polar – poliacrilato (PA), uma fase apolar - polidimetilsiloxano (PDMS), duas fases bipolar polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) e PDMS/carboxen, e uma fase tripolar PDMS/DVB/carboxen. Os melhores resultados foram obtidos utilizando a fibra de poliacrilato (PA). O método foi validado utilizando amostras de manga fortificadas nas concentrações de 33,3 - 333,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e as recuperações médias ($n = 3$) para a concentração mais baixa foram de 71,6 a 117,5%, com RSD entre 3,1-12,3%. O LD e LQ variaram 1,0-3,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e de 3,33 - 33,33 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. De acordo com os autores, todas as amostras continham os praguicidas bifentrina e azoxistrobina em concentrações de 18,3 - 57,4 e 12,7 - 55,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (abaixo do LMR da legislação brasileira), respectivamente. O método mostrou-se seletivo e apresentou LQ abaixo do LMR admitido pela legislação brasileira.

Passeport et al. (2010) preocupados com a qualidade da água desenvolveram um método de extração por SPME para determinação de 16 praguicidas com diferentes propriedades físico-químicas (isoproturon, clorotoluron, atrazina, clorotalonil, prosulfocarbe, fenpropidina etofumesato, s-metolachlor, metazachlor, napropamida, ciproconazol, aclonifen diflufenican, tebuconazol, epoxiconazol e mefenpir-dietil) utilizando um GC-MS. Todos os analitos apresentaram coeficiente de correlação superior a 0,9960, com LQ da ordem de 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$. A partir dos resultados foi observado que, para a maioria dos praguicidas, a precisão estava dentro do aceitável (menor que 20% para LQ), porém para os analitos diflufenican e clorotoluron o limite foi excedido. Maiores LQ (0,10 $\mu\text{g L}^{-1}$) foram encontrados para analitos mais polares como atrazina, metazachlor, clorotoluron, fenpropidina, ciproconazol devido à baixa afinidade destes pela fibra de SPME (PDMS/DVB). Os autores concluem que o método proposto é eficaz para determinação multirresidual de praguicidas de diferentes propriedades

físico-químicas e que as principais etapas de validação do método analítico foram bem sucedidas.

Sang et al. (2013) desenvolveram um método de HS-SPME para determinação de 11 praguicidas organofosforados (forato, diazinona, disulfoton, clorpirifós metil, fenclorfos, pirimifós metil, clorpirifós, isofenfos, fentoato, protiofos, etion) nas amostras de nabo, repolho verde, feijão verde, berinjela, maçã, nectarina e uva por GC-MS. Para a extração dos praguicidas foi selecionada uma fibra de PDMS. Para todos os analitos foram construídas 2 curvas de calibração, uma que compreendia de 0,01–0,025 mg L⁻¹ e outra de 0,5–2,5 mg L⁻¹. Boas linearidades foram obtidas com coeficientes de correlação superiores a 0,9917 para todas as amostras. As precisões intra-dia e inter-dias nos níveis de concentração de 0,05; 0,1 e 0,5 mg L⁻¹, foram de 0,3 - 7,5% e 0,2 - 9,4% respectivamente, estando dentro dos limites aceitáveis. As recuperações foram de 70 a 120% nos níveis de LMR.

Campillo et al. (2012) desenvolveram um método de HS-SPME para determinação de organoestânicos em amostras de vinho e mel comparando a sensibilidade do detector espectrometria de massa com emissão atômica. Para a extração dos compostos os autores utilizaram uma fibra de PDMS. As curvas de calibração apresentaram valores superiores a 0,992. A faixa de LD se mostrou mais sensível quando foi utilizado o detector espectrometria de massas (0,1–2,0 e 0,3–4,3 pg g⁻¹ para as amostras de vinho e mel, respectivamente), do que quando foi utilizado um detector de emissão atômica (0,5–11,1 e 2,0–22,0 pg g⁻¹ para amostras de vinho e mel, respectivamente). De acordo com os autores o método se mostrou eficiente para análises de organoestânicos em amostras de alimentos, salientando que as melhores respostas foram obtidas utilizando um espectrômetro de massas como detector.

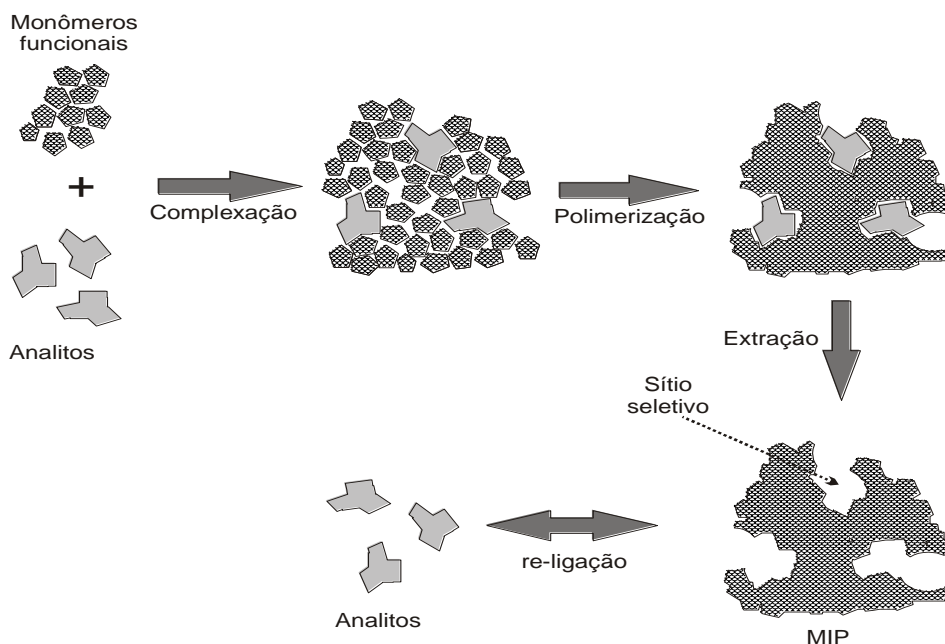
Togunde et al. (2013) desenvolveram um novo dispositivo de SPME para determinação de resíduos de fármacos (carbamazepina, diazepam e nordiazepam) em tecidos de peixes *in vivo*. O novo dispositivo continha quatro partes: a) o êmbolo com uma porca, (b) uma sonda contendo a fase de extração, (c) uma agulha hipodérmica de ponta afiada, e (d) o corpo geral do dispositivo (barril). A sonda era um fio de aço inoxidável de comprimento 20 cm e um revestimento de extração de 1,5 cm. A agulha hipodérmica foi usada para proteger a fase de extração na ponta da sonda. Além disso, a agulha foi usada para perfurar o músculo do peixe de modo que a fase de extração pudesse ser facilmente inserida no peixe. A fase de extração utilizada foi PDMS, que é um composto compatível com o tecido do peixe. No processo de extração, a fase de extração foi inserida interior do tecido do peixe permitindo que ele pudesse nadar livremente. Após o processo de amostragem a fase de extração foi retirada do músculo, lavada com água ultra pura e depois seca. Posteriormente, os analitos

foram dessorvidos em um solvente e levados para análise por LC-MS/MS. A partir dos resultados foi possível observar que o diazepam e a carbamazepina apresentaram a maior e a menor porcentagem de recuperação, respectivamente. O método apresentou RSD menor que 10% para os três analitos estudados com LDs de 0,07; 0,30; 0,34 ng ml⁻¹ (carbamazepina, diazepam, nordiazepam, respectivamente) e LQs de 0,48; 0,97; 0,40 ng ml⁻¹ (carbamazepina, diazepam, nordiazepam, respectivamente). De acordo com os autores, o novo dispositivo de SPME é promissor para a amostragem de contaminantes orgânicos em peixes.

2.5 POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS

Os polímeros de impressão molecular (MIP) têm sido muito utilizados como sorventes seletivos em preparo de amostras devido à sua capacidade de reconhecer seletivamente uma molécula ou classe de moléculas. Este modelo sintético de reconhecimento molecular surgiu através da concepção de Linus Pauling, onde o antígeno era utilizado como molécula molde para moldar a respectiva cadeia de anticorpos. A partir desta teoria começou-se a produção de polímeros com capacidade de reconhecimento molecular seletivo. Para a obtenção do MIP, uma molécula molde é posta a interagir com os monômeros funcionais. Posteriormente, é adicionado um entrecruzador que forma uma rede polimérica ao redor da molécula molde. Esta, por sua vez, é então retirada da rede polimérica por um solvente apropriado, resultando numa cavidade seletiva (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005). A Figura 2 mostra o esquema de síntese de um MIP. Esses polímeros são capazes de reconhecer uma determinada molécula através da força de ligação e das microcavidades específicas formadas entre o monômero funcional e a molécula molde (DIAS et al., 2008). A forma mais utilizada no preparo de MIP é a baseada em ligações não-covalentes, onde as interações são relativamente fracas entre o monômero e a molécula molde. Um vasto número de monômeros funcionais tem sido utilizado de acordo com a capacidade de interação com a molécula molde (TURIEL; ESTEBAN, 2010).

Figura 2 - Esquema genérico da síntese de MIP.



Fonte: Do autor

Os principais componentes para síntese de um polímero molecularmente impresso são: molécula modelo (MM), monômero funcional (MF), agente de ligação cruzada (ALC), iniciador radicalar (IR) e solvente porogênico.

A MM é usada para moldar a formação dos sítios seletivos. Ela deve conter grupos que sejam capazes de se ligar ao monômero funcional (FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008).

O MF, na maioria dos casos, deve ser básico quando se trata de molécula modelo ácida, e ácido quando se trata de molécula modelo básica. Em termos de concentração, o mais indicado é que o MF esteja em uma proporção maior em relação à MM (4:1), garantido que o deslocamento do equilíbrio da reação seja no sentido de formação do complexo MM-MF, aumentando assim o número de sítios seletivos no MIP. (FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008).

O ALC promove o entrecruzamento entre as cadeias poliméricas, promovendo a estabilidade mecânica e a integridade dos sítios de ligação. Recomenda-se utilizar uma proporção mais elevada de ALC em relação aos outros reagentes para garantir a alta porosidade do polímero favorecendo assim a difusão dos analitos pelo interior do polímero (FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008).

O IR tem como função criar radicais livres, garantido o início e a continuação do processo de polimerização (FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008).

Como na maioria das vezes a interação entre MM e MF é não-covalente, a escolha do solvente porogênico é fundamental. Portanto, é a escolha ideal do solvente que vai garantir que a interação MM e MF sejam eficientes. A utilização de solventes apolares e apróticos como tolueno, diclorometano, clorofórmio, é mais indicada. Contudo, outros solventes como acetonitrila e metanol também têm sido usados porque nem todos os reagentes são solúveis em solventes apolares (PICHON; HUGON, 2008).

De acordo com Pichon e Hugon (2008) e Santos, et al. (2012) o ácido metacrílico (MAA) ou 4-vinilpiridina (4 VP) são os MFs mais utilizados, enquanto que os ALC mais comuns são o divinilbenzeno (DVB) e o etileno glicol dimetacrilato (EGDMA). Os tipos mais usuais de síntese de MIP ocorrem pelos métodos sol-gel ou por radicais livres. O processo de síntese por sol-gel combina compostos orgânicos e inorgânicos que dão origem a novos compostos de diferentes propriedades. Sua síntese fundamenta-se em uma transição do sistema sol (partículas coloidais estáveis dispersas em fluido) para um sistema gel (estruturas rígidas de partículas coloidais ou cadeias poliméricas) (ALFAYA; KUBOTA, 2002).

No processo sol-gel, polímeros inorgânicos à base de siloxano são formados por hidrólise e condensação de monômeros de silano. O sol é formado à medida que os precursores inorgânicos sofrem hidrólise com a formação de grupos reativos do tipo silanol e estes grupos se condensam, para formar ligações siloxano. Com o tempo, as partículas de siloxano vão se agregando, levando à formação de um material poroso, uma rede tridimensional – o *gel*. A inclusão de uma MM neste processo resulta na formação de sítios seletivos (LEE et al., 2010).

O processo de síntese por radicais livres constituem o método mais utilizado em síntese de MIP. Este processo pode ser dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação. O processo de iniciação se dá quando o IR, submetido a um aumento de temperatura ou exposto a radiação UV, forma um radical livre. Este radical é então transferido para o MF (dotados de grupamentos vinílicos), dando início ao processo de polimerização. A etapa de propagação se dá quando há adição contínua de MF ao meio reacional. A finalização ocorre quando há formação de ligação covalente inativa, pela interação de dois radicais livres, interação entre radical livre e o IR ou pela transferência do sítio ativo para outra molécula. Em processos de síntese MIP, a ausência de O₂ ao meio reacional é fundamental. A presença deste pode causar uma terminação prematura da reação (SELLERGREEN, 2001).

No processo de síntese por radicais livres os MIPs podem ser sintetizados pelas metodologias em *bulk*, precipitação ou suspensão, podendo ocorrer interações covalentes e não-covalentes entre MM e MF.

Na metodologia em *bulk*, MF e MM são dissolvidos em um solvente porogênico formando ligações específicas e complementares. Posteriormente são adicionados o ALC e IR. O processo de polimerização se inicia quando os reagentes de síntese são submetidos a um banho de água a 60 °C por aproximadamente 24 horas. Após a polimerização, há formação de um monólito, que necessita ser triturado e peneirado resultando em partículas de tamanho e formato irregulares (FIGUEIREDO et al., 2008; HU et al., 2013).

Semelhante à metodologia em *bulk*, a metodologia por precipitação se diferencia apenas pela quantidade de solvente porogênico adicionado ao meio reacional. Nesta metodologia há um aumento no volume de solvente, o que vai produzir partículas de tamanho uniforme. A precipitação ocorre quando as partículas do polímero atingem uma densidade maior que da solução (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

A metodologia por suspensão os reagentes de síntese (MM, MF, ALC e IR) são dissolvidos em um solvente orgânico e posteriormente são adicionados a uma fase dispersiva polar, normalmente água, formando uma emulsão. Essa emulsão é estabilizada com a adição de um tensoativo ao meio reacional. As partículas começam a se formar quando a solução é submetida ao processo de aquecimento e agitação. Então, as partículas do polímero vão se formando na fase interna das micelas, mantendo o tamanho e formato uniforme de acordo com o tamanho da micela (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

A interação covalente reversível ocorre quando MM e MF se ligam entre si covalentemente antes da polimerização. Após a polimerização, a MM é removida pela clivagem das ligações covalentes, muitas vezes por hidrólise ácida. A elevada estabilidade da interação MM e MF leva a produção de sítios de ligação bastante homogêneos e específicos (TAMAYO et al., 2007).

A outra interação que ocorre entre MM e MF é a interação não-covalente. Esta interação é relativamente fraca, prevalecendo principalmente ligações de hidrogênio, e ligações iônicas, etc. Esta é a interação mais comumente utilizada em preparo de MIPs. Em MIPs mediados por interações não-covalentes, as reações entre MM e MF são regidas pelo equilíbrio, em que uma quantidade elevada de MF no meio reacional é requerida para deslocar o equilíbrio para formação com complexo MM-MF, aumentando assim o número de sítios seletivos no polímero. Uma vantagem deste tipo de interação é a facilidade de eluição da molécula modelo do MIP, não necessitando de clivagem drástica como hidrólise ácida. Porém

os sítios seletivos formados não são tão específicos como aqueles formados pela interação covalente (TAMAYO et al., 2007).

Sendo assim, para que os MIPs apresentem uma boa seletividade, as proporções e a escolha dos reagentes de síntese são fundamentais.

O polímero não-impreso (NIP) é frequentemente sintetizado da mesma maneira do MIP, porém não há adição de MM, não havendo assim formação de sítios seletivos como o MIP.

Devido à grande confiabilidade e a capacidade dos MIPs em reconhecer seletivamente a MM (LI, 2012) e sua grande versatilidade em processos de extrações (YAQUB; LATIF; DICKERT, 2011), muitos são os pesquisadores que utilizam desta técnica para o preparo de amostras na extração de praguicidas e outros toxicantes.

Os MIPs podem ser utilizados de diversas formas como adsorvente em fase sólida. Nesse sentido Yin et al. (2005) sintetizaram um polímero monolítico para ser utilizado como fase estacionária quiral para separação de nateglinida e o L-enantiômero. Para análises das amostras, foi utilizado um HPLC-UV. Para síntese do MIP, nateglinida, 1-ciclohexanol/dodecanol, EDMA (etilenodimetacrilato) e AA (acrilamida) foram utilizados como MM, solvente porogênico, ALC e MF, respectivamente. Para avaliar a enantioseletividade, os analitos foram submetidos a extração do MIP e do NIP, verificou-se que apenas o MIP conseguiu separar a nateglinida do L-enantiômetro. Para avaliar o bom desempenho do MIP (monólito), outro MIP em *bulk* foi utilizado como comparação. Neste estudo os autores perceberam que a separação proporcionada pelo MIP em *bulk* mostrou picos alargados, devido ao ineficiente transporte de massa causada pelas partículas de forma irregular na coluna empacotada. Em contraste o MIP monolítico apresentou picos simétricos e mais nítidos resultando em uma melhor eficiência nas análises. A partir dos resultados, fica claro que o MIP monolítico apresentou alta capacidade de separação de nateglinida e seu isômero.

Jing e colaboradores (2011) desenvolveram um método baseado na extração com MIP magnético com análise por quimioluminescência, para extração seletiva de lisozima em urina humana de pacientes com problemas renais. Nanopartículas de Fe_3O_4 foram revestidas com uma fina camada de MIP. O MIP foi sintetizado usando a lisozima, MAA, AA e MBAAm (N,N-metilenebisacrilamida) como MM, MF, co-monômero e ALC, respectivamente. O método mostrou-se rápido, de baixo custo e altamente seletivo quando comparado aos métodos tradicionais. A extração foi completada em apenas 12 minutos, com recuperações de 90,1 % - 103,7% e LQ de 5 ng mL^{-1} com de RSD menor que 6,7 %. O método demonstrou

ser confiável e muito prático, o que deixa claro para os pesquisadores que este poderá ser muito promissor para análises de rotina a fim de se diagnosticar doenças renais.

Li et al. (2013) propuseram um método de SPE para pré-concentrar ácido cafeico (CA) e éster fenetílico do ácido cafeico (CAPE) utilizando MIP como adsorventes seletivos e comparando os resultados obtidos com um adsorvente C18 convencional. As amostras de cogumelos foram analisadas por um HPLC/UV. Para síntese do MIP foi utilizado o CAPE, 4-vinilpiridina, EDMA e AIBN como MM, MF, ALC e IR, respectivamente e uma mistura de THF (tetrahidrofurano) e isoocatano (2:3 v/v) como solvente porogênico. A extração com MIP-SPE apresentou cromatogramas livres de impurezas ao contrário da extração SPE-C18. As recuperações foram de 52,3% e 83,0% e RSD 4,6% e 3,9%, para CA e CAPE, respectivamente.

Li et al. (2012) sintetizaram um MIP pelo método sol-gel para reconhecimento seletivo de creatinina (CRE) na urina. Para a síntese do MIP utilizou-se TEOS (tetraetoxisilano), CRE e $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ como precursor inorgânico, MM e fonte de Al^{+3} , respectivamente. O monólito obtido foi triturado e lavado com água desionizada para a retirada da molécula modelo. As amostras foram analisadas por espectrofotometria. Para avaliar a seletividade MIP-CRE, o seu análogo estrutural NHS (hidroxisuccinimida), Cn (creatina) e L-Tyr (l-tirosina) foram utilizados como modelos. A partir dos resultados, verificou-se que o MIP-CRE adsorvia quantidades muito maiores de creatinina do que de interferentes. Os autores concluem que MIP-CRE possui uma afinidade notável para creatinina mesmo em soluções de mistura binária.

Gosefid et al. (2012) propuseram um novo método para pré-concentração de ácido clorogênico em plantas medicinais por HPLC/UV, em que utilizam MIP pelo método de sol-gel combinado com nanotubo de carbono para preencher o interior de uma fibra oca de microextração em fase sólida (MIP-HF-SPME). Para síntese da parte orgânica do MIP foi utilizado MAA, VTEOS (vinil tetraetoxisilano), peróxido de benzoíla como MF, ALC e IR, respectivamente. Esta denominada pelos autores como solução (A). Posteriormente iniciou-se o processo de síntese da parte inorgânica, adicionando-se VTEOS, metanol, MM e água ao frasco reacional, denominado solução (B). Antes da formação do gel, foi adicionada uma alíquota da solução (A) na solução (B). Uma porção de MWCNT (nanotubos de carbono de multicamadas) foi adicionada gradualmente a mistura acima. Para o preenchimento da fibra oca de polipropileno foi utilizada uma microsseringa e as duas extremidades foram seladas para não haver vazamento da solução. Quando submetido a um processo de extração contendo interferentes como ácido gálico, cafeína e ácido cafeico obteve reconhecimento seletivo

apenas para ácido clorogênico. O método foi linear na faixa de 0,2-1000 ng ml⁻¹ com coeficiente de correlação de 0,997, LD de 0,08 ng ml⁻¹ e RSD 0,38%. Os autores concluíram que a combinação da técnica de impressão molecular e HF-SPME é uma poderosa ferramenta de preparo de amostra em termos de seletividade, simplicidade e flexibilidade sendo eficiente para extração de ácido clorogênico em amostras medicinais.

Wang et al. (2012) desenvolveram um método baseado em extração por barra de agitação revestida com MIP para detectar ractopamina em amostras de carne de porco por eletroquimioluminescência. A solução do MIP (MM, MF, ALC, IR) foi colocada em uma seringa de polipropileno e foi mantida a 60°C por uma hora. Em seguida, a barra de agitação foi imersa verticalmente no centro da mistura. O tubo foi selado e mantido a 60°C por 20 horas. O método proposto apresentou linearidade na faixa de $1,0 \times 10^{-10}$ – $5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, com coeficiente de correlação 0,9963, LD de $3,5 \times 10^{-12}$ mol L⁻¹ com RSD < 5,0%. Os autores concluíram que, comparado com outros métodos, este é simples, rápido, sensível e tem uma ampla faixa de resposta linear, tendo aplicações potenciais para a determinação da RAC não apenas em amostras de carne de porco, mas também em outros produtos animais.

2.6 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MOLECULARMENTE IMPRESSA

A combinação dos polímeros molecularmente impressos com as técnicas de preparo de amostras convencionais tem sido o foco de estudos de muitos pesquisadores. Dentre elas podemos destacar a SPE, extração em fase sólida dispersiva (MSPD), extração por barra de agitação (SBSE), extração líquido-líquido por membranas (MLLE) e a SPME (TURIEL; ESTEBAN, 2010).

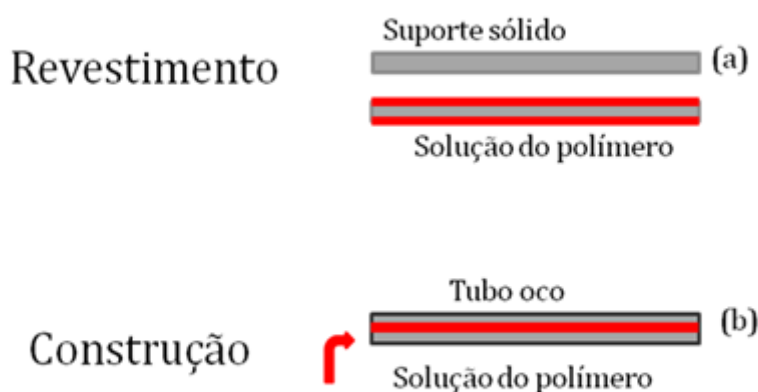
A junção da SPME com os MIPs resulta na microextração em fase sólida molecularmente impressa (MISPME). Essa associação tem sido uma combinação perfeita no preparo de amostras ambientais, alimentícias e forenses. A fibra da SPME é revestida com MIPs (QIU et al., 2010), aumentando sua sensibilidade, estabilidade e seletividade, resultando em uma ferramenta poderosa em procedimentos analíticos (DJOZAN et al., 2010). O grande sucesso da MISPME pode ser explicado pela falta de fibras comerciais dotadas de seletividade para um dado analito ou para uma classe de analitos.

As fibras de MISPME podem ser obtidas por meio do revestimento de suportes sólidos ou mesmo pela síntese da fibra na forma de monólito. O processo de revestimento é obtido

quando, por exemplo, uma superfície de aço inox (previamente preparada para receber o polímero) é utilizada como suporte sólido (Figura 3 a). O MIP é sintetizado sobre o suporte sendo quimicamente ligado ao mesmo por meio de reagentes químicos. A vantagem de se obter polímeros desta natureza é o aumento da robustez proporcionada pela superfície de aço inox (DJOZAN, 2010).

Nas fibras obtidas como monólito, a solução de síntese é inserida no interior de um tubo oco de diâmetro interno reduzido (Figura 3 b). Após o preenchimento, o tubo é selado nas duas extremidades e levado ao processo de polimerização por aquecimento. Ao final da síntese retira-se o polímero do interior do tubo oco, tendo-se então a fibra de MIP (DJOZAN, 2010).

Figura 3 - Esquema de síntese das fibras MISPME: (a) Revestimento de um suporte sólido, (b) Síntese na forma de monólito.



Fonte: Do autor

Djozan et al. (2010) sintetizaram um MIP sobre uma superfície de alumínio para extração de triazinas (ametrin, prometrin, terbutrin, atrazina, simazina, propazina e cyanazina) em amostras de arroz, água de torneira, milho e cebola, com posterior análise por GC-MS. Primeiro passo foi tratar a superfície do fio alumínio para que ela pudesse receber o MIP. Este foi então lavado em solução de detergente e água destilada várias vezes. Os fios de alumínio foram silanizados durante 2 h por imersão em uma solução de 10% (v/v) 3-(trimetoxisilil)propilmetacrilato em acetona. Em seguida, foram lavados em metanol e postos a secar em atmosfera de hélio. Para síntese do MIP, foi utilizado ametrina, MAA, EDMA, AIBN e acetonitrila como MM, MF, ALC, IR e solvente porogênico, respectivamente. Para avaliar a seletividade das fibras de MIP, elas foram submetidas à extração contendo não apenas herbicidas da classe das triazinas, mas também de outras classes, e os resultados provam que

as fibras de MIP-triazinas possuem elevada seletividade para compostos da classe das triazinas, enquanto que outros compostos não relacionados estruturalmente não mostraram quase nenhuma extração. Os LDs foram de 9 a 85 ng mL⁻¹, e os valores de precisão ficaram abaixo de 10% com recuperações maiores que 85%. Os autores concluem que o método foi de simples preparo com alto poder de detecção de praguicidas da classe das triazinas com baixo LD e altas quantidades de recuperação.

Bianchi et al. (2012) sintetizaram um MIP que revestia um suporte de sílica para substituir as fibras comerciais de SPME para análise de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) por GC-MS. Para síntese do MIP, os autores empregaram TNT, MAA, EGDMA e AIBN como MM, MF, ALC, e IR, respectivamente. Após a polimerização o MIP foi macerado. O pó obtido foi utilizado para revestir o suporte de sílica. O processo de revestimento se iniciou quando o suporte de sílica foi imerso verticalmente na cola de resina epoxi e, subsequentemente, o pó de MIP revestiu por três vezes esta superfície. A extração dos analitos de interesse ocorreu por headspace e foi utilizado o NIP e a fibra comercial de PDMS/DVB para comparação. Valores de LD 60 ng kg⁻¹ e LQ 150 ng kg⁻¹ foram obtidos com RSD menor que 3,5 % (intra-dia) e menor que 6,0% (inter-dias). Os resultados apresentados com a fibra de MIP foram superiores aos obtidos com as fibras de NIP e comercial. Os autores concluíram que o procedimento foi simples, rápido, de baixo custo, sensível e seletivo para a determinação de TNT a níveis de ng kg⁻¹.

Hu et al. (2010) sintetizaram um MIP sobre uma fibra de sílica para extrair compostos estrogênicos (17β-Estradiol, estriol, 17α -ethinilestradiol, estrona) em peixes, seguido de análise por HPLC/UV. Antes de iniciar o processo de polimerização, a fibra de sílica foi tratada para que pudesse receber o MIP. Posteriormente as fibras passaram pelo processo de silanização, sendo imersas em uma solução 3-(metacriloxi) propiltrimetoxisilano em acetona. Para a síntese do MIP foi utilizado 17β-estradiol, TRIM (Trimetilopropano trimetacrilato), MAA, AIBN e acetonitrila como MM, ALC, MF, IR e solvente porogênico, respectivamente. Então, a solução do polímero e a fibra de sílica foram transferidas para um capilar de vidro e levados a um banho de água a 65°C. Em seguida, a fibra de MIP revestida foi acoplada ao amostrador comercial de SPME. Para avaliar a capacidade seletiva do MIP revestido, ele foi submetido a uma comparação com o NIP e 3 diferentes fibras comerciais (PDMS, PDMS/DVB, CW/TPR). Os autores perceberam que a fibra de MIP revestida possuía uma maior capacidade de extração de 17β-estradiol do que as fibras comerciais investigadas. A curva de calibração estava na faixa linear de 5,0-30,0 μg L⁻¹ para estriol e 17β-estradiol e 15,0-40,0 μg L⁻¹ para estrona e 17α-Ethinilestradiol, com coeficientes de correlação superiores a

0,9975. As metodologias apresentaram LDs entre 0,98-2,31 $\mu\text{g L}^{-1}$ e precisão (intra e inter-dias) menor que 10%. As recuperações em amostras de peixe e de tecido de camarão foram de 80,0 a 83,6% e 85,0 a 94,1%, respectivamente. Os autores concluíram que a fibra de MIP revestida era muito estável e poderia ser utilizada por pelo menos 100 vezes utilizando solução padrão. Além disso, o método foi seletivo e rápido se mostrando promissor para determinação de estrogênios em amostras complexas.

Para determinação de 4 antibióticos (classe das fluoroquinolonas) em amostras de frango e de fígado de porco, Hu et al. (2012) desenvolveram um método por MISPME em tubo com posterior separação/detecção em HPLC/UV. Neste trabalho os autores sintetizaram dois MIPs, utilizando ofloxacin (OFL) e sulfametazina (SM2) como MM. Os demais reagentes de síntese foram iguais para os dois polímeros, sendo MAA, TRIM, AIBN e acetonitrila e água como MF, ALC, IR e solventes porogênicos, respectivamente. A solução de polimerização foi transferida para um capilar de vidro com auxílio de uma seringa. Após a introdução da solução do MIP, uma fibra de sílica silanizada (de menor diâmetro) foi inserida no capilar juntamente com a solução. A polimerização ocorreu em banho de água a 60 °C. Posteriormente, as fibras foram inseridas manualmente em um tubo PEEK, este contendo 6 fibras de MIP(3 fibras de MIP-OFL e 3 fibras de MIP-SM2). A curva de calibração estava na faixa de 0,2-20 $\mu\text{g L}^{-1}$ com coeficiente de correlação superiores a 0,9989. Os valores de LD e LQ estavam na faixa de 0,016-0,11 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,054-0,36 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente, com precisões intra-dia e inter-dia na faixa de 6,4-8,4% e 4,4-7,3% respectivamente.

Uma fibra de MISPME foi sintetizada por Dojozan et al. (2011) para determinação de metanfetamina em saliva com posterior determinação por GC-FID. Para a síntese do MIP foi utilizado metanfetamina, MAA, EGDMA, AIBN e acetonitrila como MM, MF, ALC, IR e solvente porogênico, respectivamente. Para a fabricação da fibra, capilares de vidros foram preenchidos por esta solução. Posteriormente, a solução foi polimerizada em um banho de água a 60 °C por 12 horas. Para avaliar a seletividade da fibra de MIP, uma solução contendo metanfetamina com alguns compostos semelhantes estruturalmente como a 3,4-metilenodioximetanfetamina e independentes como codeína, o ibuprofeno, maleato de clorfeniramina e alguns herbicidas de triazina foram submetidas à extração. A partir dos resultados observou-se que a fibra de MIP poderia extrair satisfatoriamente a metanfetamina e seus análogos estruturais, em detrimento aos outros compostos interferentes. A curva de calibração apresentou linearidade na faixa de concentração de 50 a 3500 ng mL^{-1} com coeficiente de determinação de 0,997 e LD de 14 ng mL^{-1} . Os autores concluíram que a fibra era estável, flexível e seletiva.

A síntese de uma fibra de MIP também foi proposta por He et al. (2010) para determinação de ftalatos em amostras aquosas (água de torneira, água de garrafa e água de reservatório) por GC/MS. Para síntese da fibra de MIP foi utilizado DBP (Dibutil ftalato) como MM, EDMA como ALC, MAA MF, AIBN como IR. A solução do polímero foi então inserida no interior de uma capilar de vidro e a reação de polimerização ocorreu a 60 °C por 24 horas. Para avaliar a capacidade de extração das fibras de MIP e NIP, elas foram submetidas a extrações em soluções de diferentes concentrações. Foi verificado que, a fibra de MIP reconheceu seletivamente DBP enquanto que a fibra de NIP a adsorção foi não específica. A curva de calibração apresentou linearidade na faixa de 0,01-10 µg L⁻¹ com coeficiente de determinação superior a 0,9898, LD na faixa de 2,17 ng L⁻¹ - 20,80 ng L⁻¹ e RSD de 3,6%. Os autores concluem que o método foi eficiente para determinações em amostras aquosas com baixo LD.

2.7 CULTURA DE UVA

O cultivo da videira no Brasil teve início em 1535, mas ganhou impulso apenas no século XIX tornando-se uma importante atividade socioeconômica, sobretudo no estado do Rio Grande do Sul (EMBRAPA, 2009).

No Brasil, aproximadamente 60 mil hectares de terras são destinados ao cultivo de videiras, sendo que os principais estados são: Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco, Paraná, Santa Catarina e Bahia (GIOVANINI, 1999).

Uma das alternativas de aproveitamento das culturas de uva é a elaboração do suco. O suco de uva contém todos os principais constituintes da uva, como: açúcar, minerais, ácidos, vitaminas e compostos fenólicos. É considerado uma bebida distinta, nutricional e de fácil digestibilidade (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

Os sucos de uva são constituídos por: água, açúcares (glicose e frutose), ácidos orgânicos (responsável pelo sabor ácido do suco), minerais (potássio, cálcio, magnésio, manganês, sódio, ferro, fosfatos, sulfatos e v cloretos), substâncias nitrogenadas, compostos fenólicos (responsável pela cor e adstringência), vitaminas (tiamina, riboflavina e niacina, o ácido ascórbico e o inositol), pectina (aumenta a viscosidade do suco).

Os principais cultivares de videiras para elaboração de suco de uva no Brasil são: Concord, Isabel, Bordô (todas da espécie *Vitis labrusca*) (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

Os fungicidas triazólicos em estudo são utilizados na cultura de uva no combate do oídio, ferrugem foliar e a podridão dos cachos.

As dosagens de ingrediente ativo permitido no combate dos fungos de triadimenol, tebuconazol e metconazol são 15-18 g/L, 25g/L e 9g/L, respectivamente.

3 JUSTIFICATIVA

Em consequência do uso indiscriminado de praguicidas nas lavouras, muito se discute a respeito do acúmulo destes em solos, água, alimentos e até mesmo no organismo dos seres vivos. Os praguicidas da classe dos triazóis estão incluídos na lista prioritária do âmbito da Estratégia União Europeia como um dos praguicidas que causam desregulação endócrina em humanos e animais (LI et al.,2012). Além disso, amostras ambientais e de alimentos possuem traços residuais de triazóis, necessitando então de técnicas eficientes de preparo de amostras para extração desses praguicidas. A SPME tem várias vantagens em relação às outras técnicas, principalmente quando a fibra é constituída de sorventes seletivos, como aqueles oriundos de impressão molecular.

Vários analitos têm sido extraídos de diversas amostras por MISPME. Contudo, não há relatos na literatura de extração de triazóis por essa técnica, o que certamente trará vantagens em relação a técnicas convencionais. Sendo assim, a realização desse projeto se justifica pelo ineditismo desta aplicação, além da possibilidade de introdução dessa nova linha de pesquisa no Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos. Além disso, em virtude da necessidade do monitoramento destes praguicidas em amostras ambientais e de alimentos, este trabalho também poderá fornecer resultados importantes no que diz respeito à contaminação de águas e sucos por triazóis, sendo possível inferir sobre a existência ou magnitude do risco toxicológico.

4 OBJETIVO

- a) Sintetizar uma fibra de microextração em fase sólida molecularmente impressa para determinação de triazóis em amostras de suco de uva e de água seguida por análise por GC/MS;
- b) Caracterizar morfológicamente e estruturalmente as fibras de SPME;
- c) Otimizar as condições experimentais para a extração simultânea dos fungicidas triazólicos usando a fibra de MIP;
- d) Avaliar o potencial pré-concentrador do MIP em relação ao NIP e uma fibra comercial de PDMS para a melhoria da sensibilidade na análise de fungicidas triazólicos por cromatografia gasosa/espectrometria de massas;
- e) Validar os métodos;
- f) Aplicar a metodologia para a extração/separação/quantificação de fungicidas triazólicos em águas e em amostras de suco de uva;
- g) Correlacionar os resultados obtidos com os da legislação vigente e inferir sobre o risco toxicológico desses praguicidas

5 MATERIAL E MÉTODO

5.1 AMOSTRA

Amostras de suco de uva de 4 marcas diferentes foram compradas em um supermercado da cidade de Alfenas - MG. Foram escolhidas as amostras que não possuíam soja em sua composição. Estas foram conservadas em sua embalagem própria de consumo e sob refrigeração de 2 a 8 °C até que as análises fossem realizadas.

As amostras de água foram coletadas em cinco pontos diferentes da represa de Furnas na cidade de Alfenas-MG, e em pontos próximos as plantações de café. Essas amostras foram armazenadas em frasco âmbar e sob refrigeração (2 a 8 °C) até que as análises fossem realizadas.

5.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

A água deionizada utilizada nos experimentos foi obtida através de um sistema de purificação Millipore (São Paulo, Brasil).

Os padrões triadimenol (98,5%), tebuconazol (99,6%), epoxiconazol (99,2%) e metconazol (99,5%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). As soluções estoque dos praguicidas foram preparadas em metanol na concentração de 1 mg mL⁻¹. Estas foram armazenadas em frasco âmbar sob-refrigeração (2 a 8 °C).

A partir das soluções estoque de cada padrão (tridiamenol, tebuconazol, epoxiconazol e metconazol), foram preparadas soluções intermediárias de 100 µg mL⁻¹.

Para a otimização do processo de extração foi utilizado uma solução aquosa fortificada com concentração de 1000 µg L⁻¹ de todos os analitos (tridimenol, tebuconazol, epoxiconazol e metconazol).

Para a construção da curva analítica as amostras de água e de suco de uva foram fortificadas nas concentrações de 100, 1000, 1500, 2000 e 3000 µg L⁻¹ com triadimenol, tebuconazol e metconazol, e na concentração de 500 µg L⁻¹ com epoxiconazol (padrão

interno). Vale salientar que o epoxiconazol foi utilizado como padrão interno por ser da mesma classe de triazóis e por ter sua utilização proibida na cultura de uva.

Para os testes de exatidão e precisão as amostras de água e suco de uva foram fortificadas com as soluções padrão de triadimenol, tebuconazol e metconazol nas concentrações de 100, 1000 e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ e na concentração de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de epoxiconazol (padrão interno).

Uma amostra aquosa fortificada na concentração de 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de triadimenol, tebuconazol, epoxiconazol e metconazol foi utilizada para avaliar a potencialidade de extração da fibra de MISPME em relação ao NIP e a fibra comercial de PDMS.

Para a avaliação das amostras reais de suco de uva, 4 amostras de marcas diferentes disponível comercialmente foram submetidas ao processo de extração em que apenas o padrão interno (epoxiconazol) foi utilizado para fortificar as amostras. As amostras de água foram obtidas em cinco pontos diferentes da represa de furnas e também foram fortificadas apenas com o padrão interno.

Todas as amostras foram preparadas utilizando um balão volumétrico de 25 mL. Não houve a necessidade de ajustar o pH e nem de diluir as amostras. Volumes de 25, 125, 250, 375, 500 e 750 μL de uma solução padrão de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada analito foram empregados para fortificar as amostras nas concentrações de 100, 500, 1000, 1500, 2000 e 3000 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Após a adição da solução padrão no balão volumétrico, todo o solvente foi secado com um gás inerte, e os resíduos foram dissolvidos nas próprias amostras.

Os solventes metanol e clorofórmio (grau HPLC) foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

O ácido metacrílico, etileno glicol dimetacrilato, 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila, – utilizados na síntese dos polímeros – foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

5.3 EQUIPAMENTOS

As análises foram efetuadas utilizando-se um cromatógrafo a gás acoplado a detector de massas tipo monoquadrupolo, modelo QP-2010 da Shimadzu (Tóquio, Japão) com coluna cromatográfica Restek 5% difenil 95% dimetil polisiloxano (30m x 0,25 mm x 0,25 μm).

Os demais equipamentos utilizados foram: balança analítica Kern (Balingen, Alemanha), banho de ultrassom Unique (Indaiatuba, Brasil), banho de água Novatecnica (Piracicaba, Brasil), pHmetro Tecnocon (Piracicaba, Brasil) e agitador magnético com aquecimento Novatecnica (Piracicaba, Brasil).

A microextração em fase sólida foi realizada utilizando um *holder* (Supelco, Bellefonte-PA, USA) com uma agulha adaptada. Uma fibra comercial de PDMS (Supelco, Bellefonte-PA, USA) foi utilizada como parâmetro de comparação de extração.

Um microscópio eletrônico de varredura Jeol LV-JSM 6360 (Japão) e uma câmera digital Sony-Cyber shot 10.1 megapixels, modelo DSC W170 lens-Carl Zeiss (China), foram utilizados para obtenção de imagens dos polímeros.

Para avaliar a perda de massa do polímero foi realizada uma análise termogravimétrica utilizando um aparelho SII nanotechnology (Japão), modelo TG/DTA 7300 e também um cromatógrafo CS-GC1000®, equipado com um FPD de Ciola & Gregori Ltda.

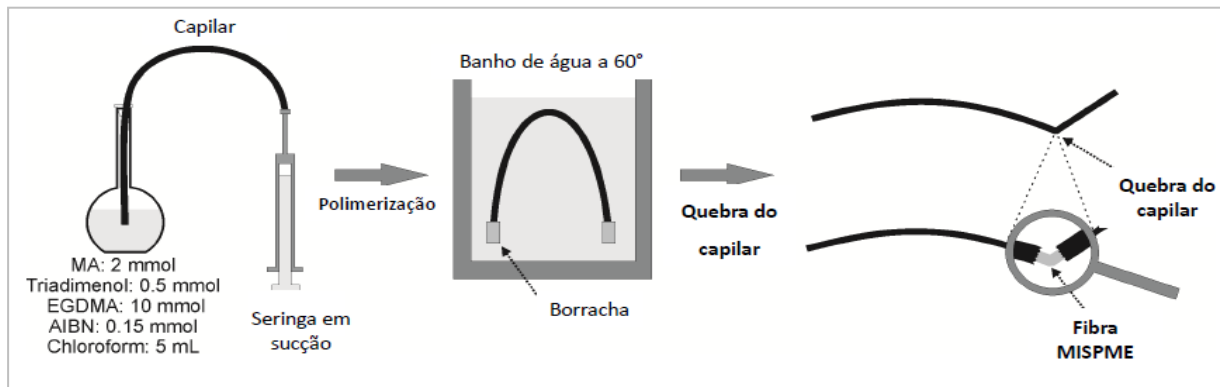
Para a avaliação da estrutura química do polímero foi utilizado um espectrômetro infravermelho por transformada de Fourier acoplado a um acessório de refletância total atenuada com resolução de 4.0. A faixa de análise estava compreendida de 4000 a 600 cm^{-1} e foram realizadas 32 varreduras.

5.4 SÍNTESE DA FIBRA DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MOLECULARMENTE IMPRESSA

A fibra de MIP foi construída pelo método de polimerização em *Bulk*. 0,05 mmol de triadimenol, 0,2 mmol de MAA, 1,0 mmol de EGDMA, 0,015 mmol de AIBN e 0,5 mL de clorofórmio foram adicionados em um tubo de ensaio e borbulhados com nitrogênio por 20 min. Em seguida, esta solução foi inserida no interior de uma coluna de cromatografia gasosa (30 cm x 0,32mm x 0,25 μm), tendo então suas extremidades seladas com uma borracha inerte. Depois, esta coluna foi imersa em banho de água a 60 °C por 24 horas para ocorrer à polimerização até resultar em um monólito (Figura 4). Após a polimerização, a fibra de MIP foi removida do interior do capilar e lavada em ultrassom com uma solução de metanol: ácido acético na proporção 9:1, v/v, para eliminação da molécula modelo e dos resíduos de síntese. Este ciclo de lavagem foi repetido até que nenhum sinal de triadimenol fosse observado pela

análise da solução de lavagem no CG-MS. Uma fibra NIP foi sintetizada da mesma forma que o MIP, porém na ausência da MM (triadimenol).

Figura 4: Processo de síntese da fibra de MISPME.



Fonte: Do autor

5.5 CARACTERIZAÇÃO

Para a caracterização das fibras de MISPME utilizando o microscópio eletrônico de varredura as amostras foram metalizadas com 10 nm de ouro.

Para a caracterização utilizando a câmera digital, uma fibra de MISPME teve uma de suas extremidades colada em uma superfície plana e escura. A extremidade que estava livre foi tensionada com a ajuda de uma ponteira em um ângulo de aproximadamente 50°.

Para a avaliação da perda de massa do polímero utilizando um aparelho de análise térmica empregou-se uma amostra de fibra de MIP de massa de 0,772 mg. Na análise foi utilizado o gás nitrogênio a uma vazão de 100 ml/min. A fibra foi exposta a uma variação de temperatura de 25 a 400 °C com uma rampa de aquecimento de 10 °C por minuto. Esse estudo foi realizado para verificar se a temperatura do injetor do cromatógrafo a gás (fixado neste trabalho em 300 °C) ocasionaria uma excessiva perda de massa na fibra de MISPME. Sabendo-se que a fibra de SPME perdia uma pequena quantidade de massa a 300 °C, foi realizado um estudo para avaliar se a perda de massa influenciaria no processo de extração. Para isto foi utilizado um CS-GC1000® e uma massa de 0,025 g de fibras de MIP, e estas foram introduzidas no interior do *linner* e pesadas antes de serem submetidas à primeira exposição de 1 minuto a 300 °C. Foram realizados 20 ciclos consecutivos de dessorção a 300 °C por 1 min. A perda de massa foi avaliada a cada ciclo por pesagem.

Para comprovar que os produtos de degradação térmica da rede polimérica das fibras de MISPME não interferiram na separação analítica, uma fibra limpa foi exposta no injetor do GC-MS na temperatura de 200 e 300°C, temperatura insuficiente e temperatura suficiente para degradação térmica, respectivamente. O GC-MS foi operado no modo scan por 60 min.

A caracterização química do polímero utilizando um espectrofotômetro de infravermelho requereu uma fibra de MIP nova (sem nenhuma exposição térmica) e uma fibra aquecida a uma temperatura de 300°C por 10 min. Este estudo foi realizado para apresentar qual seria a influência da temperatura do injetor na estrutura química do polímero.

Para avaliar a potencialidade de extração da fibra de MISPME em relação ao NIP e a fibra comercial de PDMS foram feitas 3 extrações utilizando cada fibra estudada em uma solução aquosa contendo 2000 µg L⁻¹ de cada analito (triadimenol, tebuconazol e metconazol) e do padrão interno (epoxiconazol).

5.6 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MOLECULARMENTE IMPRESSA (MISPME)

As fibras de MIP e NIP sintetizadas foram cortadas com comprimento de 1 cm aproximadamente e acopladas em um *holder* de SPME (Figura 5). Na extremidade final do *holder* foi fixada uma agulha (0,80 x 25 mm – 21 G x 1”) e então a fibra de MISPME sintetizada foi exposta ao ambiente ou recolhida pressionando-se ou soltando-se o êmbolo do *holder*, respectivamente.

Uma solução padrão de triazóis/amostra foi adicionada no interior de um *vial* de vidro, com capacidade de 15 mL, próprio para SPME. Para a extração, a fibra foi imersa nesta solução por um tempo de 7 minutos com agitação através de uma barra metálica e agitador magnético a 600 rpm a uma temperatura de 45 °C. Então, a fibra de MISPME foi recolhida para o interior do *holder* e posteriormente exposta no *liner* do CG-MS durante 1 min, para dessorção dos analitos.

Figura 5 - Fibra de MIP ou NIP (1) acoplado ao *holder* (2)



Fonte: Do autor

5.7 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

A determinação dos praguicidas foi realizada utilizando um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas. As condições de análise são apresentadas abaixo.

- a) Temperatura do injetor: 300 °C;
- b) Temperatura inicial do forno CG-MS: 120 °C;
- c) Rampa de aquecimento: 40 °C/min
- d) Temperatura final: 290 °C;
- e) Temperatura da interface: 270 °C;
- f) Temperatura da fonte: 270 °C;
- g) O fluxo de gás hélio: 10,0 mL min⁻¹;
- h) As amostras foram injetadas no modo *splitless*;
- i) Energia de ionização espectrômetro de massas: 70 eV;

O quadrupolo foi operado no modo estático (SIM: *selected ion monitoring*) como ferramenta de quantificação e, baseado na literatura (PASSEPORT, 2010), os analitos foram monitorados através das razões m/z a seguir (os valores destacados em negrito correspondem aos íons de quantificação).

- Triadimenol: **112**, 128, 168.
- Tebuconazol: **250**, 70, 125.
- Epoxiconazol: **192**, 138, 165.
- Metconazol: **125**, 145, 250.

5.8 VALIDAÇÃO

O estudo de validação foi estabelecido de acordo com as normas do FDA (DIRECTIVE 2002/657/EC).

Para amostra de água, a curva de calibração foi construída a partir de água desionizada fortificada com os analitos triadimenol, tebuconazol, e metconazol nas concentrações de 100, 500, 1000, 2000 e 3000 $\mu\text{g L}^{-1}$ e epoxiconazol na concentração de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A curva de calibração para amostra de suco de uva foi construída a partir de soluções de suco de uva fortificadas com os analitos triadimenol, tebuconazol, epoxiconazol e metconazol. Para o analito triadimenol, tebuconazol e metconazol as amostras foram fortificadas com concentrações de 100 a 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$. O epoxiconazol foi utilizado na concentração fixa de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ sendo que este foi empregado como padrão interno em todas as análises, uma vez que é proibido na cultura de uva. Em todas as análises foi realizado um $n=5$ para cada concentração.

Para o estudo de precisão e exatidão intra-dias e inter-dias ambas as amostras foram fortificadas nas concentrações de 100, 1000 e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ com os analitos triadimenol, tebuconazol e metconazol e na concentração de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ com o analito epoxiconazol. As análises foram feitas em quintuplicata para todas as concentrações na avaliação intra-dia e em triplicata na avaliação inter-dias e em 3 dias diferentes. A precisão foi expressa como o desvio-padrão relativo (RSD), de acordo com a equação: $\text{RSD} = s/x \times 100$, onde s é o desvio padrão e x é a média. A precisão foi expressa como o erro relativo (E), de acordo com a equação: $E = (AC - NC) / NC \times 100$, onde AC é a concentração analisadas e NC é a concentração nominal.

O LQ foi definido como a menor concentração que pode ser analisada com precisão e exatidão, enquanto que o LD foi definido como sendo a concentração que gera um sinal três vezes o ruído da linha base.

Todos os dados apresentados na etapa de validação foram expressos em área relativa (área absoluta do analito/ área absoluta do padrão interno).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 SÍNTESE DA FIBRA DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MOLECULARMENTE IMPRESSA

A escolha e as proporções de cada reagente de síntese foram fundamentais para o bom desempenho da fibra de MISPME.

Sabendo que o MIP possui uma maior capacidade de absorção pela MM (MORAES et al., 2013), escolheu-se o triadimenol como tal visto que ele possui o menor valor de limite de quantificação.

O bom desempenho de um MIP está relacionado ao grande número de poros existentes, bem como a maleabilidade e seletividade do polímero. O MF é responsável pela formação dos sítios seletivos. Sendo assim, a maior proporção deste reagente em relação à molécula modelo tem sido empregada para garantir a formação de um maior número de sítios seletivos quando se trata de síntese de MIP por interação não-covalente (SELLERGREEN 1984; MARTÍN-SETBAN 2001). A alta porosidade do polímero está relacionada também com a proporção do ALC em relação ao MF (CORMACK; ELORZA, 2004). Como era requerido que a fibra proposta apresentasse boa maleabilidade e sem que houvesse quebra do polímero, uma grande proporção de ALC foi empregada, no sentido de aumentar a densidade da rede polimérica, tornando-a mais estável.

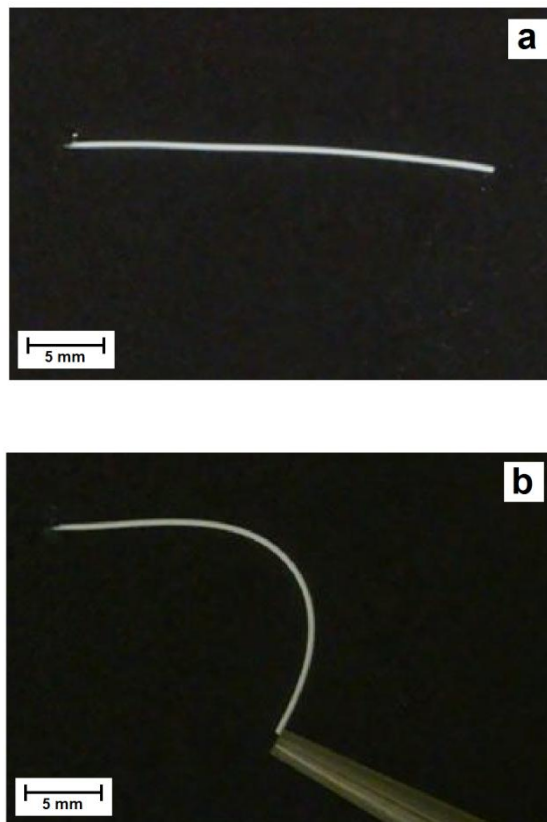
O solvente porogênico tem como principal função dissolver todos os reagentes de síntese (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005). A sua proporção em relação aos outros componentes da síntese é de total importância para garantir estabilidade mecânica ao polímero e a quantidade de poros (CORMACK; ELORZA, 2004). Um dos problemas mais críticos enfrentados durante a realização do trabalho foi selecionar o volume ideal de solvente porogênico em que o polímero apresentasse alta porosidade e flexibilidade. O solvente porogênico (clorofórmio), quando adicionado em volume menor que 500 μL , resultou em uma fibra extremamente quebradiça e com baixo poder de difusão dos analitos. Por outro lado, quando um volume acima de 500 μL foi empregado, a fibra resultante foi altamente flexível. Concluiu-se também que a quantidade de solvente está intimamente ligada à estabilidade mecânica do polímero, a quantidade de poros existentes e a facilidade na difusão dos analitos (MARTÍN-ESTEBAN, 2001).

6.2 CARACTERIZAÇÃO

6.2.1 Avaliação da Flexibilidade

A fibra de MIP apresentou alta flexibilidade podendo ser curvada em até 50° aproximadamente sem quebra, como pode ser observado pela Figura 6. Ressalta-se que a escolha dos reagentes de síntese e a proporção dos mesmos foram fundamentais para obtenção de uma fibra com essas características (HE, 2010).

Figura 6 - Fibra de MISPME (a) não tensionada e (b) tensionada em ângulo de 50° , aproximadamente.

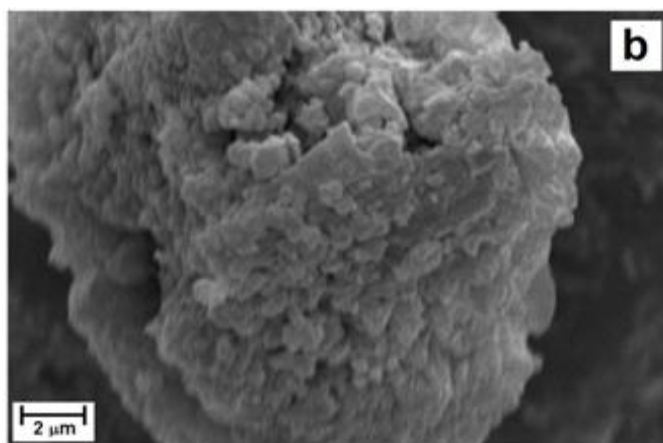
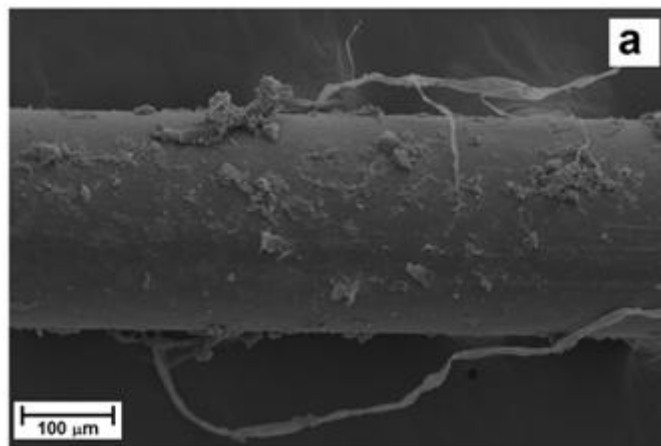


Fonte: Do autor

6.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura fornece informações sobre morfologia e identificação de compostos químicos sólidos com uma resolução de até 300.000 vezes (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). Como pode ser observado pelas micrografias apresentadas na Figura 9, a fibra apresentou uma superfície externa regular (Figura 7a), além de uma alta porosidade (Figura 7b) que contribui para o alto poder de difusão dos analitos pelo seu interior (HU et. al, 2009). Esta alta porosidade fez com que o equilíbrio de sorção entre a amostra e a fibra e de dessorção entre a fibra e o injetor do cromatógrafo a gás fossem atingidos rapidamente, em apenas 7 minutos e 1 minuto, respectivamente.

Figura 7 - Microscopia eletrônica de varredura da fibra de MISPME: (a) aumento maior e (b) aumento menor, mostrando a alta porosidade apresentada pela fibra



Fonte: Do autor

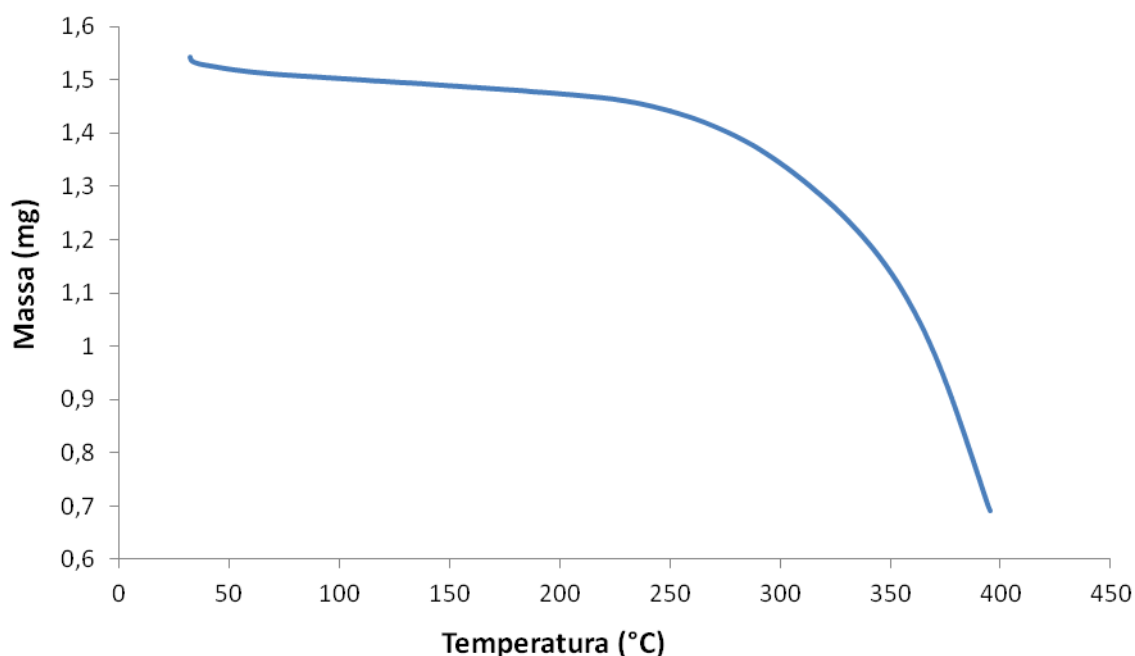
6.2.3 Análise Termogravimétrica (TG) e Estudo de Dessorção

A TG é uma técnica que avalia a perda de massa de uma substância em função da temperatura. A partir da variação da perda de massa de uma amostra, pode-se inferir sobre a estabilidade e a perda de compostos voláteis do composto analisado (MENCZEL, 2009).

Para avaliar se a temperatura do injetor do cromatógrafo a gás (fixado neste trabalho em 300°C) resultaria em uma perda de massa excessiva na fibra de MISPME, esta foi submetida a uma análise termogravimétrica com uma variação de temperatura de 25 a 400 °C com uma rampa de aquecimento de 10 °C.

A partir da análise da Figura 8 foi possível concluir que houve perda de massa da fibra de MISPME a partir de cerca de 280 °C, sendo que essa perda de massa pode ser ocasionada pela eliminação de compostos voláteis, principalmente H₂O e CO₂ (KRUL et. al, 2009). A partir da temperatura de 350 °C há uma intensa perda de massa ocasionada pela clivagem das ligações mais estáveis presentes no polímero (KRUL et. al, 2009).

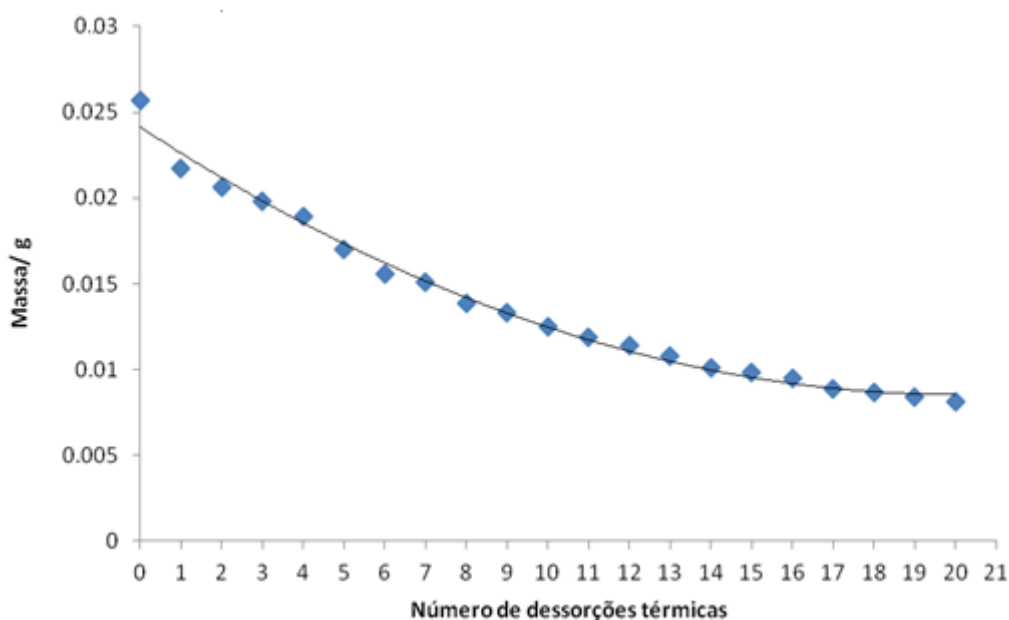
Figura 8 - Estudo termogravimétrico de uma fibra de MISPME de 25 a 400 °C com uma rampa de aquecimento de 10 °C.



Fonte: Do autor

Visto que havia uma pequena perda de massa para temperaturas de 300 °C, o próximo estudo foi verificar até que ponto esta perda de massa influenciaria negativamente no processo de extração, caso o injetor do GC-MS operasse em 300 °C, que foi a temperatura ideal para dessorção dos analitos. Para isto, uma massa de 0,025 g de fibras foi introduzida no *liner* de um GC e pesadas antes de serem submetidas a primeira exposição de 300 °C. Após a pesagem inicial, as fibras foram submetidas a 20 exposições consecutivas a 300 °C por 1 minuto. A perda de massa foi avaliada a cada ciclo de exposição e está apresentada graficamente na Figura 9.

Figura 9- Estudo da perda de massa da fibra de MISPME após 20 dessorções consecutivas de 1 min no injetor de um cromatógrafo a gás a 300 °C.



Fonte: Do autor

A partir da Figura 9, observa-se que há uma perda gradual de massa de polímero ao longo das injeções sequenciais. Pode-se concluir então que a perda de massa do polímero não é alta o suficiente para atrapalhar no processo de extração, visto que, a partir de um dado número de injeções, a perda de massa tende a ficar gradualmente menor. Além disso, verificou-se experimentalmente que a fibra apresentou uma vida útil de, pelo menos, 50 extrações consecutivas, com DPRs < 15 %.

Com base nos resultados apresentados acima, sugere-se que as fibras de MISPME apresentam uma superfície renovável (Figura 10). Ou seja, após cada exposição térmica, há

uma degradação superficial do polímero, eliminando possíveis sítios obstruídos pela amostra, e expondo novos sítios de ligação que anteriormente estavam incrustados na rede polimérica.

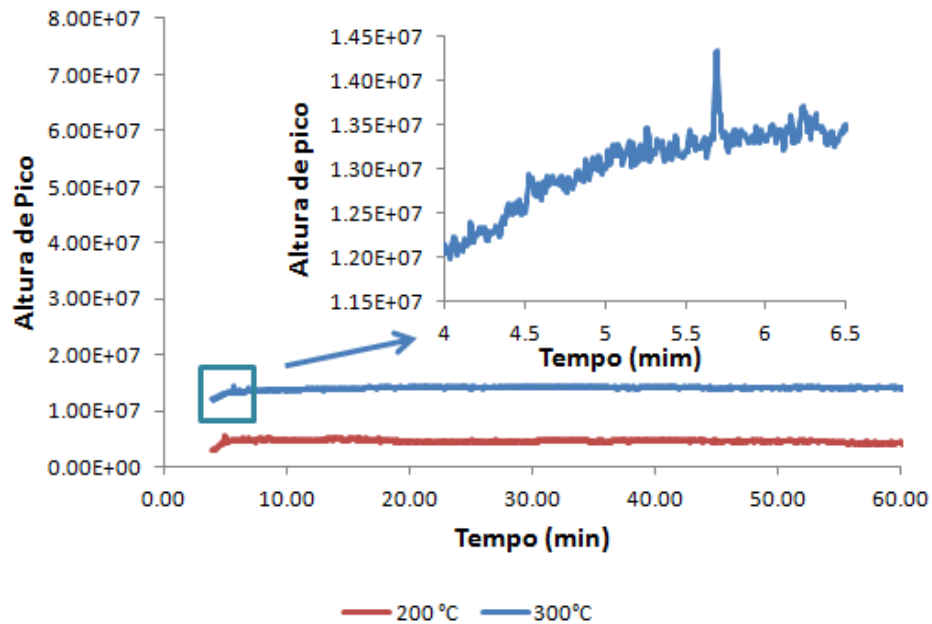
Figura 10- Hipótese para superfície renovável da fibra de MISPME.



Fonte: Do Autor

Para comprovar que os produtos de degradação térmica (CO_2 , H_2O) (KRUL et. al, 2009) da rede polimérica das fibras de MISPME não interferiram na separação analítica, uma fibra limpa foi exposta no injetor do GC-MS na temperatura de 200 e 300 °C, temperatura insuficiente e temperatura suficiente para degradação térmica, respectivamente. O GC-MS foi operado no modo scan por 60 min. A partir da Figura 11, verifica-se que ambos cromatogramas são semelhantes, mostrando que os produtos de degradação térmica não comprometem a separação dos analitos estudados, cujos tempos de retenção variam de 4,3 a 6,5 min. Além disso, a mesma coluna analítica ainda foi utilizada para toda a otimização e validação dos métodos empregando o injetor a 300 °C, e nenhuma mudança foi observada em sua performance.

Figura 11 – Cromatograma da exposição da fibra de MISPME nas temperaturas de 200 e 300 °C.



Fonte: Do autor

6.2.4 Análises de infravermelho

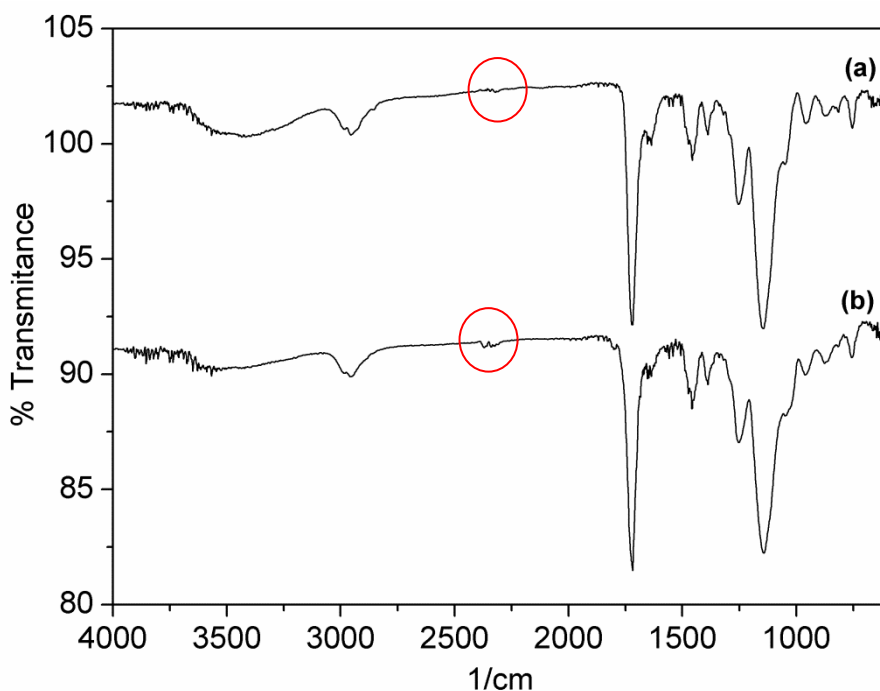
A maioria dos compostos com ligações covalentes absorvem várias frequências de radiação eletromagnética na região do infravermelho no espectro eletromagnético. A espectroscopia de absorção do infravermelho com transformada de Fourier tem como aplicação a determinação de grupos funcionais (SILVERSTEIN et al., 2006).

A Figura 12 apresenta dois espectros, um de uma fibra de MISPME sem ser aquecida (a) e outro de uma fibra de MISPME aquecida por 10 min a uma temperatura de 300°C (b). Com base no espectros pode-se observar um pico intenso entre 1600 a 1800 cm^{-1} . Essa banda é característica de compostos que possuem grupos carbonila em sua composição (SILVERSTEIN et al., 2006), como por exemplo o EGDMA (ALC) (Figura 13), utilizado na síntese do polímero. A banda apresentada em 2800 e 3000 cm^{-1} é característica de hidroxila (OH) de ácido carboxílico (SILVERSTEIN et al., 2006). Essa banda caracteriza a presença do MAA (MF) (Figura 13) utilizado na síntese do polímero. A partir da Figura 12, observa-se que o perfil dos espectros da fibra nova (sem aquecimento) e aquecida, é praticamente o mesmo, a não ser por uma pequena diferença observada na banda de 2400 cm^{-1} ,

aproximadamente, que indica a presença de grupos CN (tripla ligação) (SILVERSTEIN et al., 2006) advindos possivelmente do AIBN (IR) (Figura 13) que foi utilizado na síntese do polímero. Os espectros mostram que na fibra não aquecida (Figura 12 a) esse grupos estão nas partes mais interna do polímero, ao contrário do que se observa na fibra aquecida (Figura 12 b), onde esses grupamentos estão mais expostos na parte superior do polímero, reforçando a hipótese de que o polímero apresenta superfície renovável após o aquecimento.

Este comportamento é bem vindo para as fibras MISPME porque se um sítio de ligação é obstruído pela matriz da amostra durante a extração, este sítio pode ser degradado durante a dessorção, e novos sítios de ligação são expostos. Este fenômeno ocorre em cada ciclo de dessorção, evitando a obstrução gradativa dos sítios seletivos pela matriz da amostra e aumentando o tempo de vida da fibra.

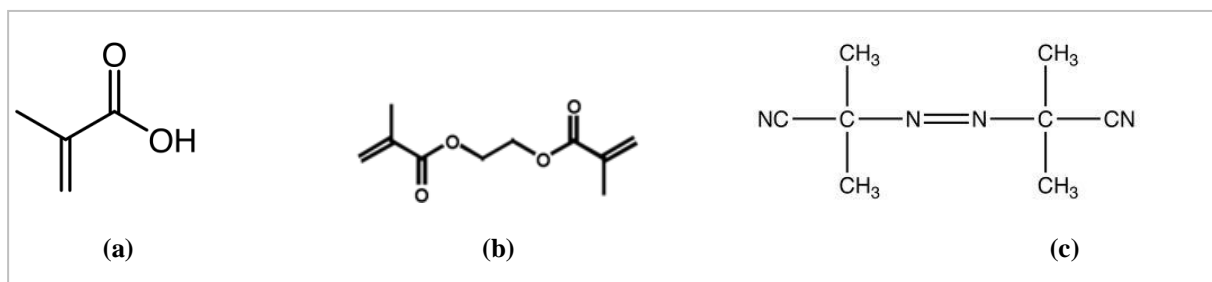
Figura 12 - Espectro de Infravermelho para (a) uma fibra nova de SPME sem aquecimento (b) e uma fibra aquecida no interior de *liner* de um cromatógrafo a gás durante 10 min a 300°.



Fonte: Do autor

Na Figura 13 encontram-se as estruturas químicas dos reagentes de síntese do MIP.

Figura 13 - Estrutura química dos reagentes de síntese das fibras de MISPME (a) MAA, (b) EGDMA, (c) AIBN

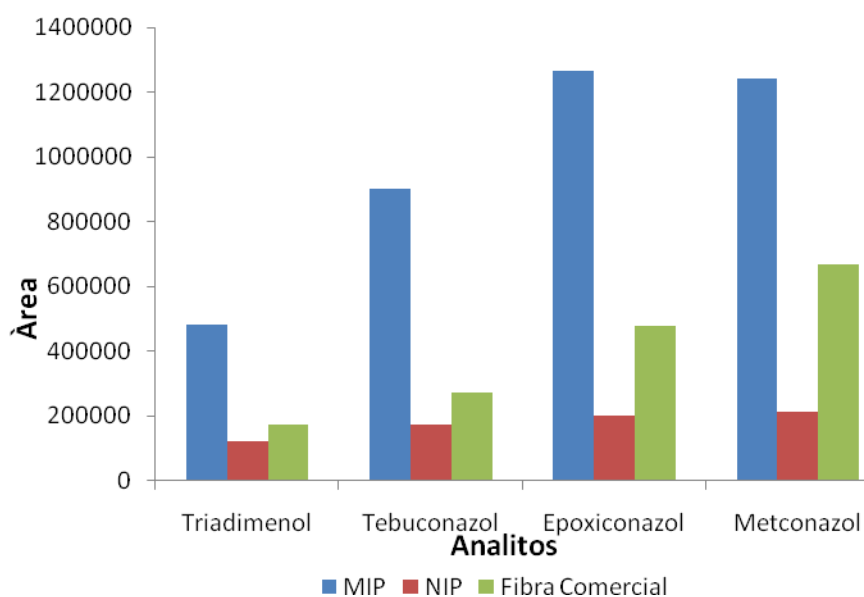


Fonte: FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008)

6.2.5 Comparação NIP, MIP e fibra comercial

A Figura 14 mostra a grande potencialidade na extração da fibra de MIP em relação às outras fibras para todos os analitos estudados. Os dados comprovam a maior capacidade adsorptiva da fibra de MIP em relação às fibras de NIP e PDMS. Tal fato pode ser justificado pela possível presença de sítios de ligação na fibra de MIP, em comparação às demais. Além disso, vale ressaltar que a menor área do triadimenol (MM) em relação aos demais analitos se deve à sua menor detectabilidade na técnica em questão.

Figura 14 - Estudo de comparação da extração entre MIP, NIP e PDMS (solução em água 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$). n=5.



Fonte: Do autor

O mesmo teste para verificar a potencialidade de extração das fibras de MIP foi realizado por Bianchi et al. 2012, neste trabalho os autores sintetizaram um MIP ao redor de um suporte de sílica para extração de TNT em entulhos. Os resultados apresentados pelos autores comprovam a potencialidade superior do MIP em relação ao NIP e a fibra de PDMS/DVB. A fibra de MIP apresentou uma área média cerca de 10 vezes maior que a área apresentada pelo NIP, e quase o dobro de área em relação à fibra comercial de PDMS/DVB. Estes dados comprovam que a fibra de MIP proposta nesse trabalho apresenta características semelhantes e até mesmo superiores às fibras apresentadas pelos autores.

6.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO

Estudos univariados foram realizados para se determinar a influência de cada variável no procedimento de extração. As variáveis estudadas foram: temperatura de extração, velocidade de agitação da barra magnética, efeito de *salting out*, tempo de extração.

A otimização de cada variável foi feita empregando-se 15,0 mL de uma solução aquosa com os padrões de triazóis na concentração de 1,0 mg L⁻¹ em meio aquoso. O tamanho da fibra foi fixado em 1,0 cm aproximadamente. Todos os resultados apresentados na otimização do processo de extração estão expressos em valores absolutos. Foram feitas 3 réplicas de cada ponto.

As condições cromatográficas para o estudo foram:

- a) Temperatura do injetor: 300 °C;
- b) Temperatura inicial do forno CG-MS: 120 °C;
- c) Rampa de aquecimento: 40 °C/min
- d) Temperatura final: 290 °C;
- e) Temperatura da interface: 270 °C;
- f) Temperatura da fonte: 270 °C;
- g) O fluxo de gás hélio: 10,0 mL min⁻¹;
- h) As amostras foram injetadas no modo *splitless*;
- i) Energia de ionização espectrômetro de massas: 70 eV;
- j) O quadrupolo foi operado no modo estático (SIM: *selected ion model*) como ferramenta de quantificação e, baseado na literatura (PASSEPORT, 2010), os analitos

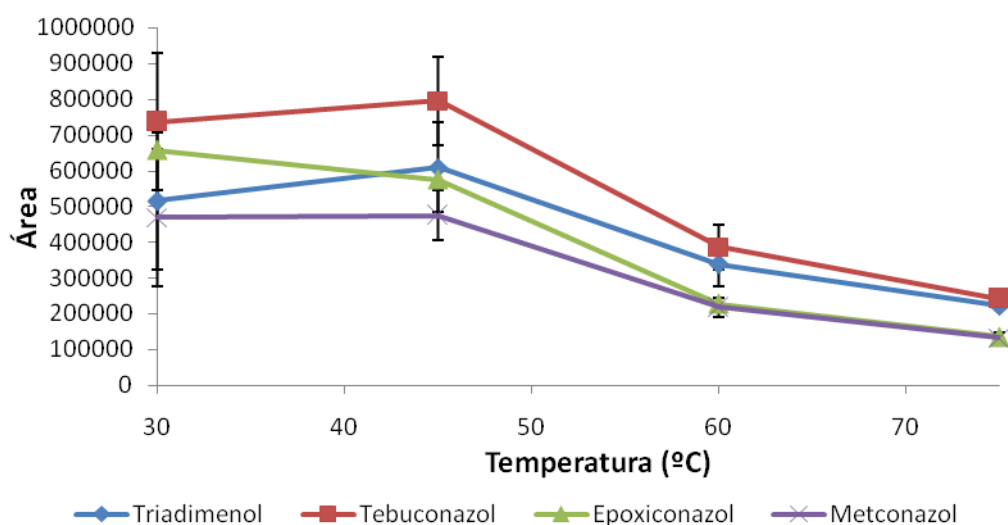
foram monitorados através das seguintes razões m/z: Os valores destacados em negrito correspondem aos íons de quantificação.

- Triadimenol: **112**, 128, 168.
- Tebuconazol: **250**, 70, 125.
- Epoxiconazol: **192**, 138, 165.
- Metconazol: **125**, 145, 250.

6.3.1 Temperatura de extração

A temperatura de extração possui influência significativa no processo de extração porque aumenta a velocidade do transporte dos analitos da matriz para a fibra. A temperatura foi avaliada nesse estudo de 30 a 75 °C, e as melhores respostas foram obtidas com a temperatura de 45 °C, definida como condição de trabalho (Figura 15). Temperaturas maiores que 75 °C não foram investigadas devido à possibilidade de degradação dos analitos (PAWLISZYN, J. 1997). Então o tempo de exposição da fibra foi fixado em 7,0 minutos.

Figura 15 - Influência da temperatura na resposta analítica (Solução aquosa na concentração de 1 mg L⁻¹) n=3.

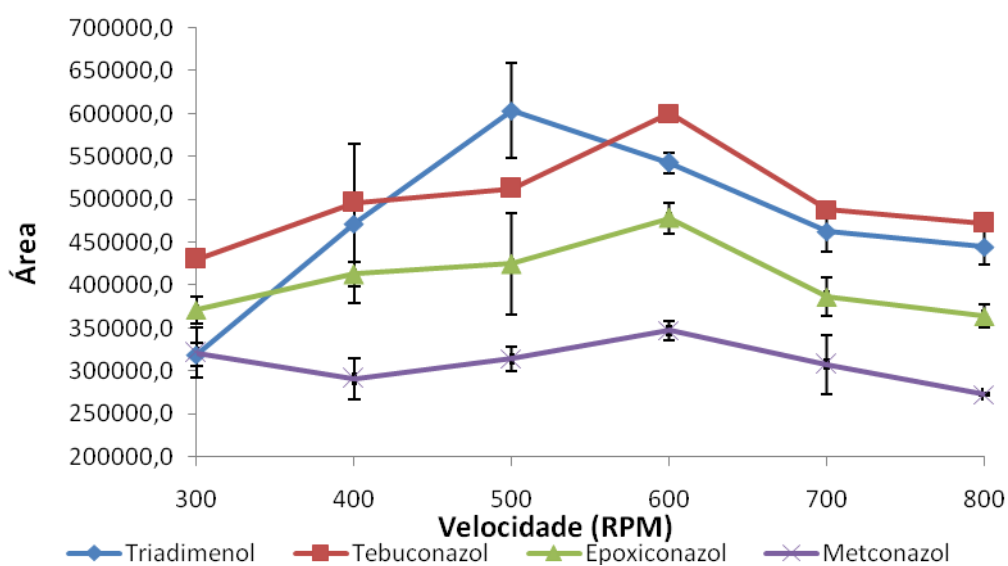


Fonte: Do autor

6.3.2 Velocidade de Agitação

A agitação foi usada para acelerar a transferência de massas da solução para a fibra, aumentando a eficiência e reduzindo o tempo de extração. Este parâmetro foi avaliado de 300 a 800 rpm. Um aumento da eficiência de extração foi observado com o aumento da velocidade de agitação de 300 a 600. Valores maiores de velocidade de agitação resultaram em diminuição do sinal analítico (Figura 16), devido à grande turbulência gerada no sistema, que adicionalmente causou uma grande variação nos sinais além da possibilidade iminente de quebra da fibra. Sendo assim, a velocidade de 600 rpm foi fixada como condição de trabalho.

Figura 16 - Influência da velocidade de agitação na resposta analítica (Solução aquosa na concentração de 1 mg L^{-1}) $n=3$.



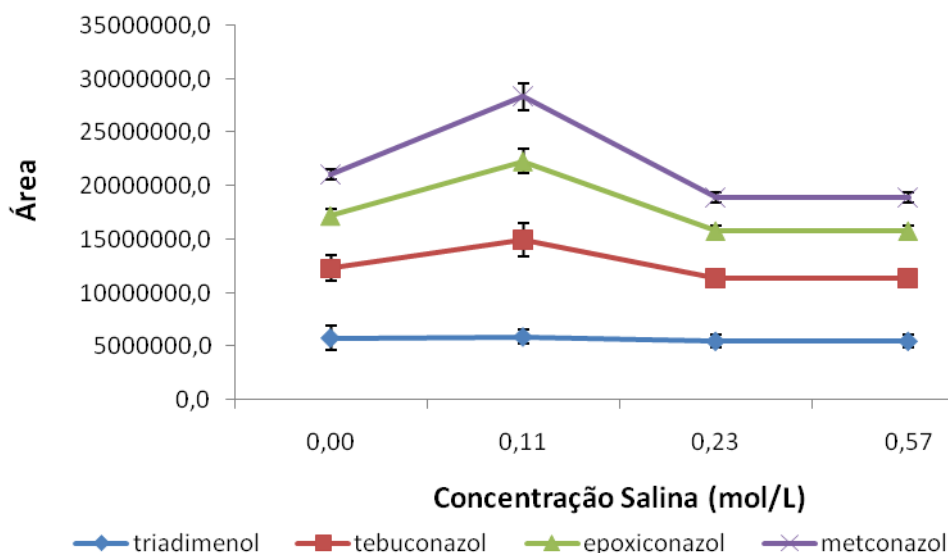
Fonte: Do autor

6.3.3 Efeito *salting-out*

O efeito de *salting out* foi estudado adicionando à amostra massas crescentes de NaCl, resultando em concentrações de 0 a $0,57 \text{ mol L}^{-1}$ como demonstrado na Figura 17. Os

resultados permitiram concluir que a concentração de $0,11 \text{ mol L}^{-1}$ foi a que apresentou melhor sinal analítico, sendo então selecionada como condição de trabalho.

Figura 17 – Influência da adição de sal na resposta analítica (Solução aquosa na concentração de 1 mg L^{-1}) $n=3$

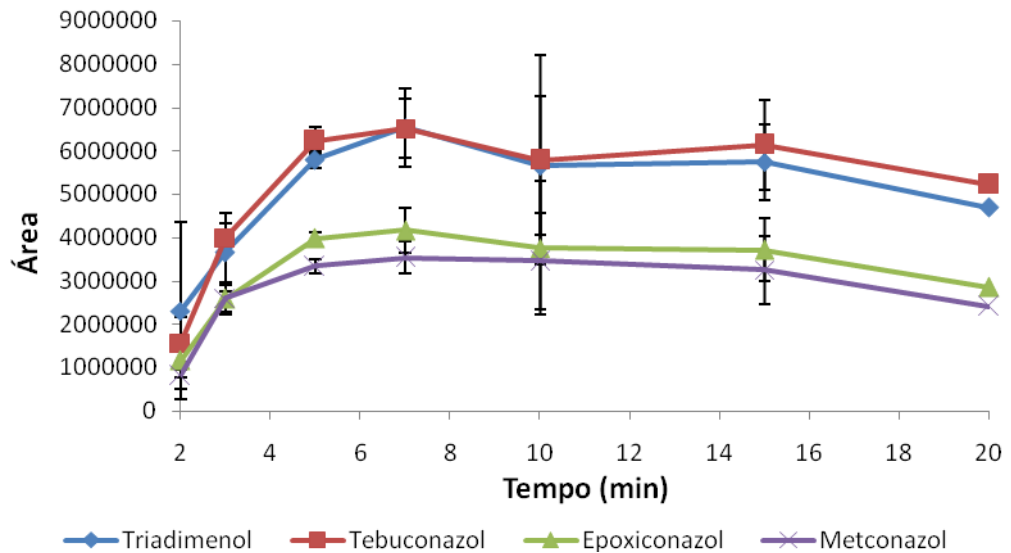


Fonte: Do autor

6.3.4 Tempo de extração

O tempo necessário para o estabelecimento do equilíbrio entre a matriz e a fibra de MISPME foi avaliado de 2,0 a 20,0 minutos. Notou-se que o equilíbrio foi estabelecido com 7 min, havendo uma ligeira perda de eficiência após 15 minutos (Figura 18). Como possível explicação, a exposição excessiva da fibra causa possivelmente uma hidratação de regiões mais internas do polímero, resultando no fenômeno de inchaço do polímero, que está relacionado à maior maleabilidade dos sítos de ligação fazendo com que as ligações analito-MIP sejam mais facilmente desfeitas. Esse fenômeno é comumente reportado na literatura sobre MIPs (SELLERGREN, 2001). Então o tempo de exposição da fibra foi fixado em 7,0 minutos.

Figura 18 - Influência do tempo de extração na resposta analítica (Solução aquosa na concentração de 1 mg L^{-1} n=3).



Fonte: Do autor

6.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

Quando um método analítico é desenvolvido, ele deve ser validado para que possa ser utilizado em laboratórios de rotina e gerar dados confiáveis sobre a amostra. Neste trabalho, a validação foi estabelecida de acordo com as normas do FDA (DIRECTIVE 2002/657/EC).

As figuras de mérito são os indicadores do bom desempenho do método analítico, e são descritas como: o ajuste matemático dos dados, detectabilidade do método (representada pelos limites de detecção e quantificação), precisão e exatidão.

O método proposto foi validado para amostras de água e de suco de uva, separadamente, como apresentado abaixo.

6.4.1 Amostra de Água

6.4.1.1 Ajuste matemático dos dados

A curva analítica para amostra de água foi ajustada ao modelo quadrático através da adição dos três analitos estudados (triadimenol, tebuconazol e metconazol) nas concentrações de 100 , 500, 1000, 2000 e 3000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Epoxiconazol na concentração de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi empregado como padrão interno.

Na Tabela 2 estão apresentados os dados do ajuste matemático com o método proposto. Verifica-se um bom do ajuste dos dados até mesmo para altas concentrações, já que as curvas de calibração apresentaram R^2 acima de 0,99 para os três analitos estudados (triadimenol, tebuconazol e metconazol).

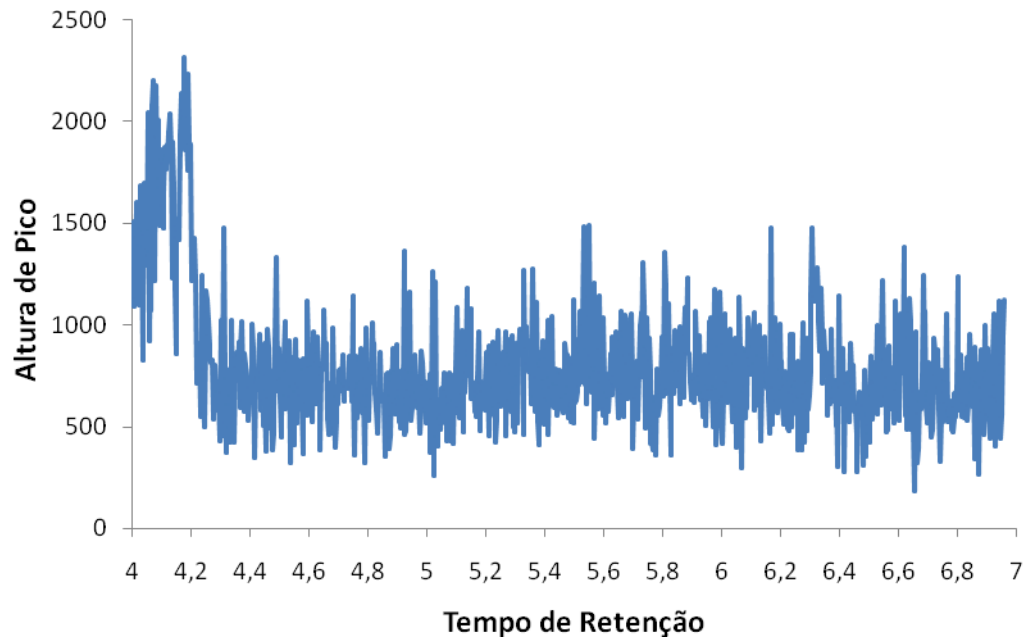
Tabela 2- Ajuste dos dados para amostra de água utilizando a MISPME.

Analitos	Faixa analítica ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação da reta	R^2
Triadimenol	100-3000	$y=4,3\text{E}-08x^2+1,4\text{E}-03x+2,3\text{E}-01$	0,999
Tebuconazol	100-3000	$y=5,1\text{E}-08x^2+6,7\text{E}-04x+7,5\text{E}-02$	0,999
Metconazol	100-3000	$y=1,2\text{E}-07x^2+6,1\text{E}-04x+1,4\text{E}-01$	0,999

Fonte: Do autor

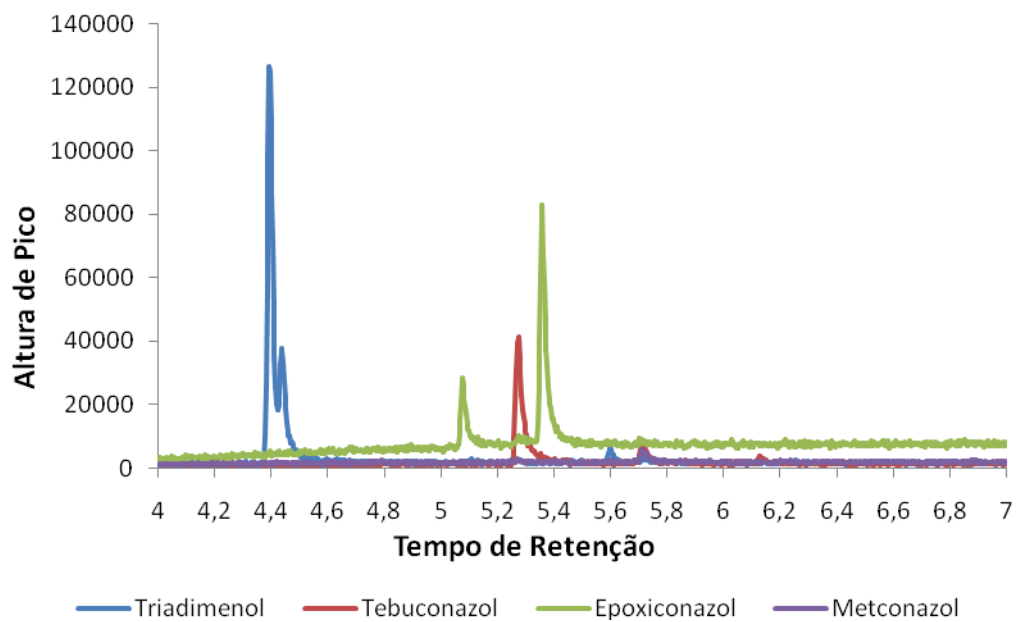
A Figura 19 apresenta o cromatograma obtido quando a fibra foi inserida no injetor do cromatógrafo sem nenhuma extração, o que comprova a eficiência do processo de limpeza da fibra após a síntese uma vez que não houve sinal relativo à molécula modelo (triadimenol, ou qualquer outra molécula). A Figura 20 apresenta cromatograma de amostra de água fortificada com os analitos na concentração de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os tempos de retenção dos analitos em estudo são: triadimenol - 4,42 min, tebuconazol – 5,32 min, epoxiconazol – 5,41 min e metconazol – 5,77 min.

Figura 19 - Cromatograma da fibra de MISPME obtido antes das extrações das amostras.



Fonte: Do autor

Figura 20 - Cromatograma de uma amostra de água fortificada com os analitos triadimenol, tebuconazol, e metconazol na concentração de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ e epoxiconazol (PI) na concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$.



Fonte: Do autor

6.4.1.2 LD e LQ

Os LD e LQ apresentados na Tabela 3 foram obtidos através do método razão sinal/ruído e menor concentração quantidade quantificada com exatidão e precisão, respectivamente, para amostra de água. Órgãos internacionais adotam como LMTs em águas a concentração de $0,1\mu\text{g L}^{-1}$ para cada praguicida e de $0,5\mu\text{g L}^{-1}$ para um total deles (DIRECTIVE 2006/118/EC). A partir dos dados, verifica-se que o método não apresentou boa detectabilidade para esse tipo de amostra. Contudo, salienta-se que o ele pode ser utilizado³ em situações onde há suspeita de contaminação ambiental com triazóis em níveis mais elevados, como por exemplo, em águas que margeiam culturas que fazem uso desses praguicidas.

Tabela 3- Estudo de LQ e LD para amostra de água utilizando a MISPME.

Analitos	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD	LQ
Triadimenol	100-3000	30	100
Tebuconazol	100-3000	30	100
Metconazol	100-3000	30	100

Fonte: Do autor

6.4.1.3 Exatidão e Precisão

A exatidão e a precisão do método foram avaliadas utilizando os padrões nas concentrações de 100, 1000 e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4- Precisão e exatidão para análise do triazol triadimenol em água por MISPME.

Triadimenol				
Intra-dia (n=5)	CN ^a	100,00	1000,0	2000,0
	CA ^b	129,8	987,0	2028,0
	DPR ^c /%	31,2	9,6	14,2
	E ^d /%	29,8	-1,2	1,4
Inter-dia (n=3)	CN ^a	100,0	1000,0	2000,0
	CA ^b	97,7	878,7	1966,6
	DPR ^c /%	28,0	10,0	15,0
	E ^d /%	-2,0	-12,0	7,0

^a Concentração nominal ($\mu\text{g L}^{-1}$). ^b concentração analisada ($\mu\text{g L}^{-1}$). ^c Coeficiente de variação. ^d Erro relativo.
Fonte: Do autor

Tabela 5- Precisão e exatidão para análise do triazol tebuconazol em água por MISPME.

Tebuconazol				
Intra-dia (n=5)	CN^a	100,0	1000,0	2000,0
	CA^b	99,2	979,3	2011,8
	DPR^c/%	12,1	13,8	10,4
	E^d/%	-0,8	-2,0	1,4
Inter-dia (n=3)	CN^a	100,0	1000,0	2000,0
	CA^b	127,1	891,6	2144,1
	DPR^c/%	23,0	10,0	15,0
	E^d/%	27,0	-11,0	7,0

^a Concentração nominal ($\mu\text{g L}^{-1}$). ^b concentração analisada ($\mu\text{g L}^{-1}$). ^c Coeficiente de variação. ^d Erro relativo.
Fonte: Do autor

Tabela 6 - Precisão e exatidão para análise do triazol metconazol em água por MISPME.

Metconazol				
Intra-dia (n=5)	CN^a	100,0	1000,0	2000,0
	CA^b	75,0	1057,2	2092,8
	DPR^c/%	14,6	13,9	10,9
	E^d/%	-25,0	5,7	4,6
Inter-dia (n=3)	CN^a	100,0	1000,0	2000,0
	CA^b	117,9	1129,1	2353,0
	DPR^c/%	26,0	12,0	12,0
	E^d/%	18,0	13,0	18,0

^a Concentração nominal ($\mu\text{g L}^{-1}$). ^b concentração analisada ($\mu\text{g L}^{-1}$). ^c Coeficiente de variação. ^d Erro relativo.
Fonte: Do autor

A partir dos dados obtidos no estudo de validação para amostra água, verifica-se que os resultados não estão de acordo com os órgãos de regulamentação visto que o LMT em águas é na concentração de $0,1\mu\text{g L}^{-1}$ para cada praguicida e de $0,5\mu\text{g L}^{-1}$ para um total deles (DIRECTIVE 2006/118/EC). Sendo assim, optou-se pela avaliação do método na análise de amostras suco de uva, visto que os LMR são notadamente maiores nessas amostras.

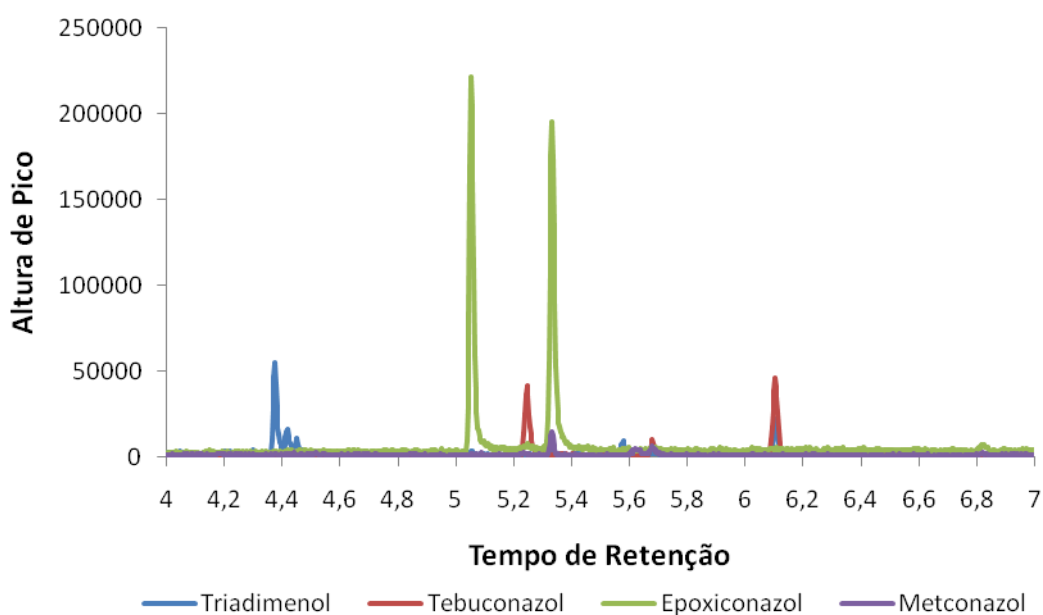
6.4.2 Amostra de Suco de uva

6.4.2.1 Ajuste matemático dos dados

A curva analítica para amostra de suco de uva foi ajustada ao modelo quadrático e construída através da adição dos três analitos estudados (triadimenol, tebuconazol e metconazol) nas concentrações de 100, 500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Epoxiconazol na concentração de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi empregado como padrão interno em todos os casos. Vale salientar que o epoxiconazol foi selecionado como padrão interno por ser da mesma classe de triazóis e por ter sua utilização proibida na cultura de uva. Ressalta-se que a curva foi construída em cima de uma amostra de suco de uva branca, no sentido de minimizar o efeito de matriz.

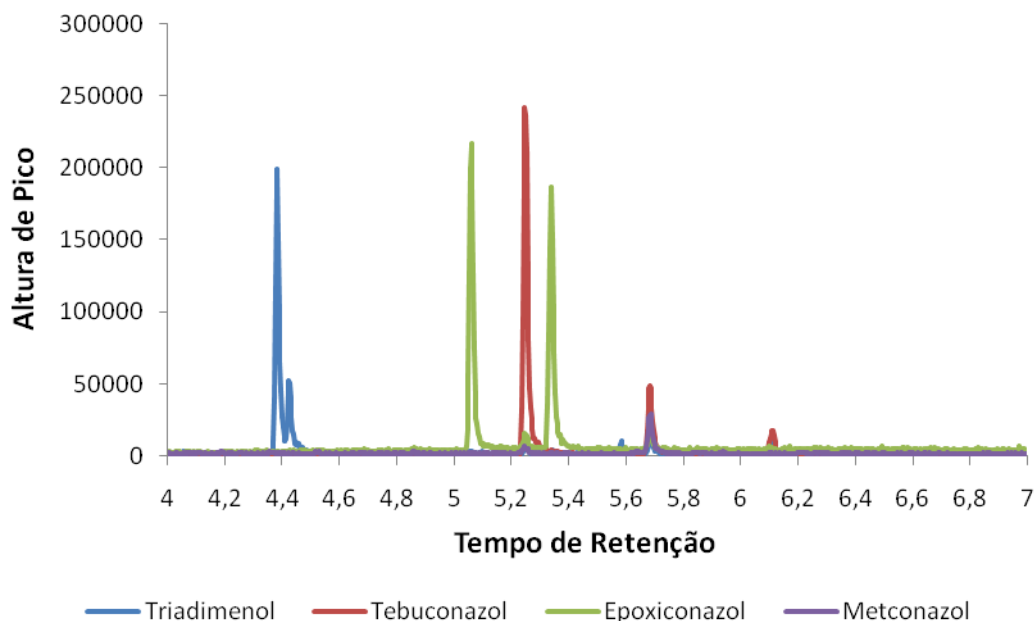
As Figuras 21 e 22 apresentam cromatogramas de uma amostra de suco de uva (branco) fortificada apenas com o padrão interno (epoxiconazol), uma amostra de suco de uva (branco) fortificada com todos os analitos no nível do limite de quantificação e na concentração de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os tempos de retenção dos analitos em estudo são: triadimenol - 4,42 min, tebuconazol - 5,32 min, epoxiconazol - 5,41 min e metconazol - 5,77 min. Como pode ser visto, os cromatogramas apresentam praticamente os picos dos analitos, comprovando a não existência de interferentes nas referidas análises.

Figura 21 - Cromatograma da fibra de MISPME extraindo os analitos triadimenol 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, tebuconazol 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, epoxiconazol 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (PI) e metconazol 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ em amostra de suco de uva (nível do LQ).



Fonte: Do autor

Figura 22 - Cromatograma de fibra de MISPME extraindo os analitos triadimenol, tebuconazol, metconazol na concentração de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ e epoxiconazol (PI) na concentração de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ em amostra de suco de uva.



Fonte: Do autor

Na Tabela 7 estão apresentados os dados do ajuste matemático para os três analitos obtidos com o método proposto:

Tabela 7- Ajuste dos dados para amostra de suco de uva utilizando a MISPME.

Analitos	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação da reta	R^2
Triadimenol	100-2000	$y=9,4\text{E-}08x^2+7,6\text{E-}04x+1,4\text{E-}01$	0,999
Tebuconazol	100-2000	$y=1,3\text{E-}07x^2+8,9\text{E-}04x+1,8\text{E-}01$	0,997
Metconazol	100-2000	$y=1,0\text{E-}07x^2+1,4\text{E-}03x+2,2\text{E-}01$	0,999

Fonte: Do autor

É possível observar que mesmo para as altas concentrações foi verificado o bom ajuste, já que as curvas de calibração apresentaram R^2 acima de 0,99 para os três analitos estudados (triadimenol, tebuconazol e metconazol) confirmando o bom ajuste dos dados.

Nos cromatogramas das figuras 21 e 22 pode-se observar um importante fator referente ao analito triadimenol. Este é formado por 4 estereoisômeros (2 pares de diastereoisômeros) que apresentam 2 tempos de retenção diferentes. Entretanto, a separação da linha de base desses dois picos não pode ser separada adequadamente com as condições em

estudo. Com tudo, não houve nenhum problema na validação para o analito triadimenol (HUND et al., 2000).

6.4.2.2 LQ e LD

Os LD e LQ apresentados na Tabela 8 foram obtidos através do método razão sinal/ruído e menor quantidade quantificada com exatidão e precisão, respectivamente, para amostra de suco de uva. A partir dos dados, verifica-se que os analitos estudados tiveram boa detectabilidade quando extraídos pelo método proposto. Para amostra de suco de uva o método é considerado confiável e aplicável para a faixa de concentração apresentada. De acordo com o MAPA, os LMRs de resíduos para triadimenol, tebuconazol e metconazol em suco de uva são respectivamente, 100, 2000 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, mostrando que o método é eficiente para tal aplicação.

Tabela 8- Estudo de LQ e LD para amostra de suco de uva utilizando a MISPME.

Analitos	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD	LQ
Triadimenol	100-2000	30	100
Tebuconazol	100-2000	30	100
Metconazol	100-2000	30	100

Fonte: Do autor

Bedendo et. al (2012) propôs um método para determinação de tebuconazol em amostra de suco de laranja, suco de laranja light e suco de laranja fresco por HF-MMLLE (Extração líquido-líquido por membrana oca microporosa) e posterior análise em LC/MS/MS. Neste trabalho encontrou como LD e LQ para suco de laranja, suco de laranja light e suco de laranja fresco os valores de 330 $\mu\text{g L}^{-1}$, 490 $\mu\text{g L}^{-1}$, 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1110 $\mu\text{g L}^{-1}$, 1600 $\mu\text{g L}^{-1}$, 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

A partir dos dados apresentados pelos autores, observa-se que o método proposto no trabalho alcançou LD e LQ inferiores aos descritos na literatura para amostras de sucos, provando ser eficiente na determinação de praguicidas triazólicos em amostra de suco de uva.

6.4.2.3 Exatidão e Precisão

A exatidão e a precisão do método foram avaliadas utilizando os padrões nas concentrações de 100, 1000 e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para triadimenol, tebuconazol e metconazol. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 9, 10 e 11.

Tabela 9- Precisão e exatidão para análise do triadimenol em suco de uva por MISPME.

Triadimenol				
Intra-dia (n=5)	CN^a	100,0	1000,0	2000,0
	CA^b	104,3	1005,4	1999,4
	DPR^c/%	15,0	13,2	16,2
	E^d/%	4,3	0,5	-0,1
Inter-dia (n=3)	CN^a	100,0	1000,0	2000,0
	CA^b	108,6	998,2	1985,5
	DPR^c/%	2,0	4,4	2,4
	E^d/%	8,6	-0,2	-0,7

^a Concentração nominal ($\mu\text{g L}^{-1}$). ^b concentração analisada ($\mu\text{g L}^{-1}$). ^c Coeficiente de variação. ^d Erro relativo.
Fonte: Do autor

Tabela 10- Precisão e exatidão para análise do tebuconazol em suco de uva por MISPME.

Tebuconazol				
Intra-dia (n=5)	CN^a	100,0	1000,0	2000,0
	CA^b	86,3	1039,8	2017,4
	DPR^c/%	22,1	8,9	14,6
	E^d/%	-13,7	4,0	0,9
Inter-dia (n=3)	CN^a	100,0	1000,0	2000,0
	CA^b	94,3	1105,9	2200,2
	DPR^c/%	2,9	6,4	12,8
	E^d/%	-5,7	10,6	10,0

^a Concentração nominal ($\mu\text{g L}^{-1}$). ^b concentração analisada ($\mu\text{g L}^{-1}$). ^c Coeficiente de variação. ^d Erro relativo.
Fonte: Do autor

Tabela 11- Precisão e exatidão para análise do metconazol em suco de uva por MISPME.

Metconazol				
Intra-dia (n=5)	CN^a	100,0	1000,0	2000,0
	CA^b	118,0	1000,9	1989,6
	DPR^c/%	17,6	13,5	5,9
	E^d/%	18,0	0,1	-0,5
Inter-dia (n=3)	CN^a	100,0	1000,0	2000,0
	CA^b	85,4	1100,6	2144,8
	DPR^c/%	8,2	7,6	9,9
	E^d/%	-14,6	10,1	7,2

^a Concentração nominal ($\mu\text{g L}^{-1}$). ^b concentração analisada ($\mu\text{g L}^{-1}$). ^c Coeficiente de variação. ^d Erro relativo.
Fonte: Do autor

A partir dos dados obtidos, pode-se observar que a exatidão e precisão intra-dia e inter-dia estão de acordo com as normas estabelecidas pelo FDA (DIRECTIVE 2002/657/EC). Para o analito tebuconazol houve um desvio de 2,1% no valor da precisão intra-dia na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, porém, este desvio é aceitável visto que o LMR preconizado para tal é 10 vezes maior a concentração em que houve o desvio. Sendo assim pode-se dizer que o método é confiável para determinação de praguicidas triazólicos em amostra de suco de uva.

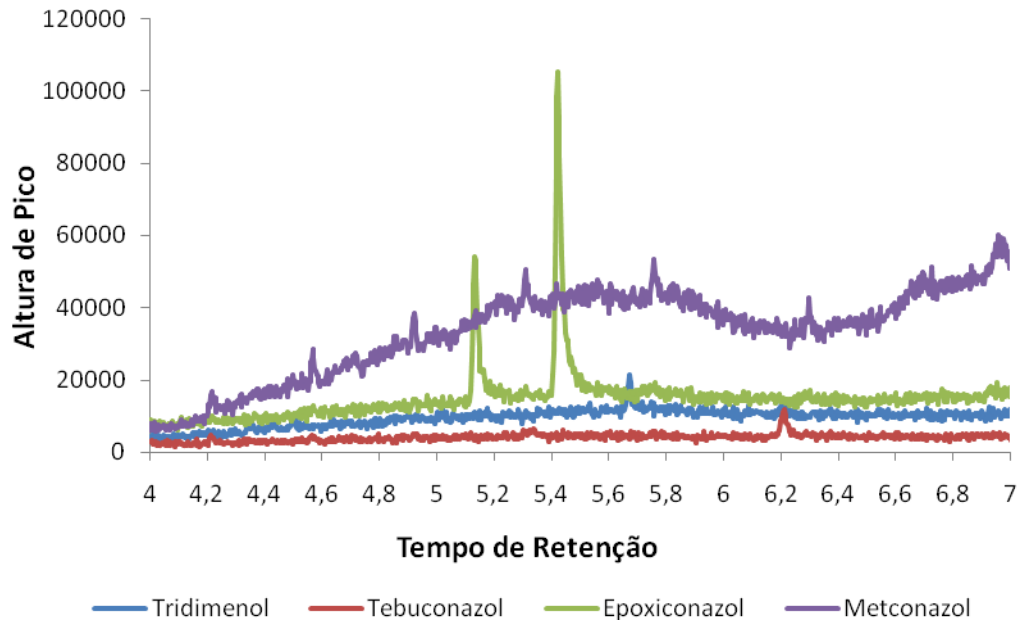
6.5 ANÁLISE DAS AMOSTRAS REAIS

O método proposto foi aplicado para quatro amostras de suco de uva e cinco amostras de água para verificação da possível presença dos analitos triazólicos.

De todas as 9 amostras analisadas, nenhuma apresentou pico nos tempos de retenção do triadimenol, tebuconazol e metconazol, atestando que as amostras não apresentava os analitos de interesse no nível de detecção do método proposto.

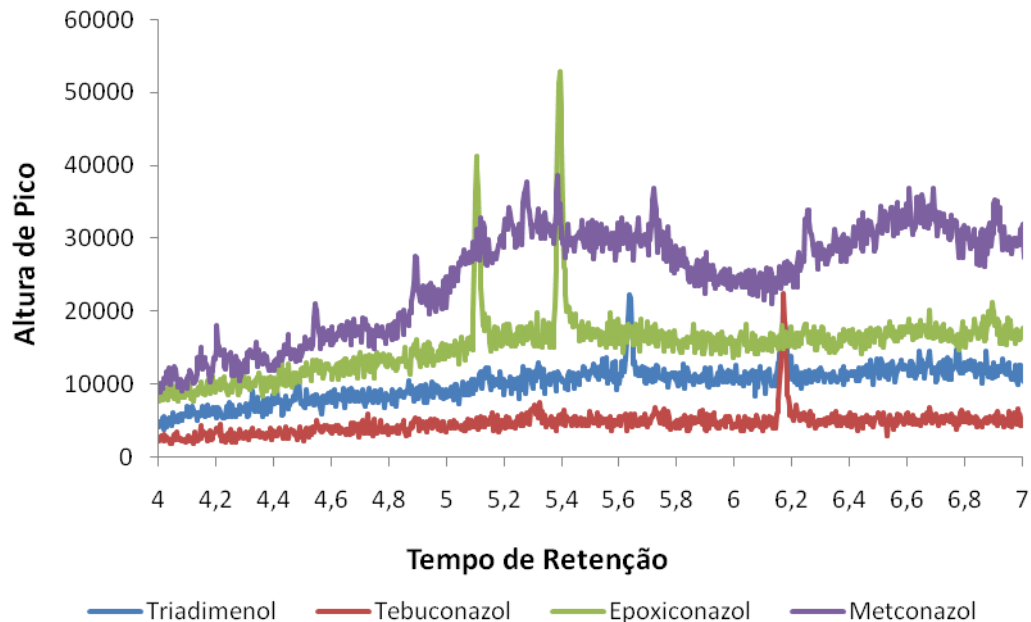
As figuras 23 e 24 apresentam os cromatogramas de uma amostra de suco de uva e de uma amostra de água.

Figura 23 – Cromatograma de uma amostra real de suco de uva (triadimenol - 4,42 min, tebuconazol 5,32 min, epoxiconazol – 5,41 min e metconazol – 5,77 min). Amostra fortificada apenas com o PI (epoxiconazol 500 $\mu\text{g L}^{-1}$).



Fonte: Do autor

Figura 24 – Cromatograma de uma amostra real de água (triadimenol - 4,42 min, tebuconazol – 5,32 min, epoxiconazol – 5,41 min e metconazol – 5,77 min). Amostra fortificada apenas com o PI (epoxiconazol 500 $\mu\text{g L}^{-1}$).



Fonte: Do autor

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi proposta pela primeira vez uma fibra de microextração em fase sólida molecularmente impressa com uma superfície que se renova a cada ciclo de dessorção a 300 °C no injetor do GC-MS. O processo de renovação superficial foi devido à decomposição térmica gradual da superfície polimérica da fibra, resultando em uma fibra com alta seletividade e sensibilidade em até 50 ciclos de dessorção.

Ao se utilizar da técnica MISPME, foi possível a não utilização de solventes orgânicos e a pré-concentração dos analitos de interesse com uma alta seletividade.

O tempo de agitação da solução foi fundamental para os resultados satisfatórios do trabalho, em que se conseguiram os melhores resultados (tempo de equilíbrio entre fibra e amostra - partição) em apenas 7 minutos extração. Foi verificado também que a adição de NaCl na amostra promoveu um aumento significativo do sinal analítico em relação a extração das amostras que não continham o sal.

O método desenvolvido para amostras de água e de suco uva apresentaram bom ajuste dos dados ao modelo quadrático $R^2 > 0,99$.

Para análise de resíduos em suco de uva o método atendeu as especificações do MAPA (Ministério da Agricultura e Pecuária de Abastecimento) que preconiza que a quantidade máxima dos analitos triadimenol, tebuconazol e metconazol presentes em amostras de uva, que devem ser, 0,1 mg L⁻¹, 2 mg L⁻¹ e 1 mg L⁻¹ respectivamente.

Por fim, o método proposto para análise de triazóis em suco de uva atendeu a todas as especificações requeridas, como exatidão e precisão inferiores a ± 20% para o LQ e inferiores a ± 15% para as outras concentrações, sendo aplicável com confiança para análise de triazóis em amostras de suco de uva.

Para amostra de água o método não atingiu os limites preconizados pelos órgãos regulamentadores. Contudo, o método pode ser utilizado em situações onde há suspeita de contaminação ambiental com triazóis em níveis mais elevados, como por exemplo em águas próximas a plantações em que se faz uso desses praguicidas.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B9884-1-0%5D.PDF>>. Acesso em: 5 de maio 2013.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): relatório de atividades de 2010**, Brasília, 2011. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b380fe004965d38ab6abf74ed75891ae/Relat%C3%B3rio+PARA+2010+-+Vers%C3%A3o+Final.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 5 de maio 2013.
- ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A Utilização de Materiais Obtidos pelo Processo de Sol-Gel na Construção de Biossensores. **Química Nova**, v. 25, p. 835-841, 2002.
- ALMEIDA, M. E. W. Pesticide Residue Analysis as an Appropriate Control of Good Agricultural Practice. **Studies in Environmental Science**, v. 18, p. 247-254, 1982.
- ALVES FILHO, J. P. Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos. São Paulo: Annablume, Fapesp, 2002.
- BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**, v. 24, p. 172-175, 2001.
- BEDENDO, G. C.; JARDIM, I. C. S. F.; CARASEK, E. Multiresidue determination of pesticides in industrial and fresh orange juice by hollow fiber microporous membrane liquid-liquid extraction and detection by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 88, p. 573-580, 2012.
- BIANCHI, F.; GIANNETTO, M.; MORI, G.; D'AGOSTINO, G.; CARERI, M.; MANGIA, A. Solid-phase microextraction of 2,4,6-trinitrotoluene using a molecularly imprinted-based fiber. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 403, p. 2411-2418, 2012.
- BORDAGARAY, A.; ARRONA, R. G.; MILLÁN, E. Optimization of Solid-Phase Microextraction Procedure Coupled to GC-ECD for Triazole Fungicides Determination in Juice Samples. **Food Analytical Methods**, v. 4, p. 293-299, 2011.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DE ABASTECIMENTO (MAPA). **Secretaria de Defesa Agropecuária**. 2011. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/IN%2025_2011%20-%20Ano-safra%202011-12\(2\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/IN%2025_2011%20-%20Ano-safra%202011-12(2).pdf)>. Acesso em: 8 de maio 2013.
- CAMPILLO, N.; VINÃS, P.; PENÁLVER, R.; CACHO, J. I.; CÓRDOBA, M. H. Solid-phase microextraction followed by gas chromatography for the speciation of organotin compounds in honey and wine samples: A comparison of atomic emission and mass spectrometry detectors. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 25 p. 66-73, 2012.
- CONAMA. **Qualidade da Água**. 2008. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=562>>. Acesso em: 11 de set. 2013.

CORMACK, P.A.G.; ELORZA, A.Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization. *Journal Chromatography B: Anal. Technol. Biomed. Life Science*, v. 804, p.173-182, 2004.

DEDAVID, B.A; GOMES, I.C; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

DIAS, A. C. B.; FIGUEIREDO, E. C.; GRASI, V.; ZAGATTO, E. A. G.; ARRUDA, M. A. Z. Molecularly imprinted polymer as a solid phase extractor in flow analysis. *Talanta*, v.76, p. 988-996, 2008.

DIRECTIVE 2002/657/EC. **Journal Official**. L 221 p. 0008 – 0036, 2002. Disponível em: lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:EN:PDF. Acesso em: 11 de set. 2013.

DIRECTIVE 2006/118/EC. **Journal Official**. L372, 2006. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:372:0019:0019:EN:PDF>> Acesso em: 11 de set. 2013.

DJOZAN, D.; ALI, M.; FARAJZADEH, M. A.; SOROURADDIN, S.M.; BAHERI, T. Synthesis and Application of High Selective Monolithic Fibers Based on Molecularly Imprinted Polymer for SPME of Trace Methamphetamine. *Chromatographia*, v.73. p. 75-983, 2011.

DJOZAN, D.; EBRAHIMI, B.; MAHKAM, M.; FARAJZADEH, M. A. Application for the fabrication of triazines selective solid-phase microextraction fiber. *Analytica Chimica Acta*, v. 674, p. 40-48, 2010.

DROGUÉ, S.; DeMARIA, F. Pesticide residues and trade, the apple of discord. *Food Policy*, v. 37, p. 641–649, 2012.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos** – Documento nº 48. Bento Gonçalves-RS, 2009. Disponível em: <<http://www.cnpv.embrapa.br/publica/documentos/doc048.pdf>> Acesso em: 6 de set. 2013.

FERREIRA, C. R. R. P. T.; CAMARGO, M. L. B.; VEGRO, C. L. R. Defensivos Agrícolas: comercialização recorde em 2011 e expectativas de acréscimo nas vendas em 2012. *Análises e Indicadores do Agronegócio*, v. 7, p. 1-5, 2012.

FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, A. C. B.; ARRUDA, M. A. Z. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 44, p. 361-375, 2008.

GIOVANINI, E. **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. Porto Alegre: Renascença, 1999.

GOLSEFIDI, M. A.; ES'HAGHIA, Z.; YAZDIC, A. S. Design, synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer for hollow fiber–solid phase microextraction of chlorogenic acid in medicinal plants. *Journal of Chromatography A*, v. 1229, p. 24– 29, 2012.

HASS, U.; BOBERG, J.; CHRISTIANSEN, S.; JACOBSEN, P.R.; VINGGAARD, A.M.; TAXVIG, C.; POULSEN, M.F.; HERMANN, S.S.; JENSEN, B.H.; PETERSEN, A.; AXELSTAD, M. Adverse effects on sexual development in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine disrupting pesticides. **Reproductive Toxicology**, v. 34, p. 261–274, 2012.

HE, F. Biological monitoring of occupational pesticides exposure. **Int Arch Occup Environ Health**, v. 65, p. S69-S76, 1993.

HE, J.; LV, R.; ZHAN, H.; WANG, H.; CHENG, J.; LU, K.; WANG, F. Preparation and evaluation of molecularly imprinted solid-phase micro-extraction fibers for selective extraction of phthalates in an aqueous sample. **Analytica Chimica Acta**, v. 674, p. 53–58, 2010.

HU, X.; DAI, G.; JIAJING HUANG, J.; YEA, T.; FAN, H.; YOUWENA, T.; YU, Y.; LIANG, Y. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 5875–5882, 2010.

HU, Y.; SONG, C.; LI, G. Fiber-in-tube solid-phase microextraction with molecularly imprinted coating for sensitive analysis of antibiotic drugs by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1263, p. 21–27, 2012.

HU, Y.; WANG, Y.; CHEN, X.; HU, Y.; LI, G. A novel molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber coupled with high performance liquid chromatography for analysis of trace estrogens in fishery samples. **Talanta**, v. 80, p. 2099–2105, 2010.

HU, Y.; PAN, J.; ZHANG, K.; LIAN, H.; LI, G. Novel applications of molecularly imprinted polymers in sample preparation. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 37–52, 2013.

HUANG, Y.; ZOU, Q.; XIE, G. Development of sensitive determination method for fungicides from environmental water samples with Titanate nanotube array micro-solid phase extraction prior to high performance liquid chromatography. **Chemosphere**, v. 90, p. 338–343, 2013.

HUND, E.; HEYDEN, Y. V.; HAUSTEIN, M.; MASSART, D. L.; SMEYERS-VERBEKE, J. Robustness testing of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay: comparison of fractional and asymmetrical factorial designs **Journal Chromatograph A**, v. 874, p. 167–185, 2000.

JARDIM, A. N.O.; CALDAS, E. D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food. Results from 2001 to 2010. **Food Control**, v. 25, p. 607–616, 2012.

JING, T.; XIAO, H.; GUAN, Q.; LU, W.; DAI, Q.; NIU, J. Rapid and selective determination of urinary lysozyme based on magnetic molecularly imprinted polymers extraction followed by chemiluminescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 692, p. 73–79, 2011.

KATAOKA, H.; SAITO, K. Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 926–950, 2011.

KEIKOTLHAILE, B. M.; SPANOGHE, P.; STEURBAUT, W. Effects of food processing on pesticide residues in fruits and vegetables: A meta-analysis approach. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1–6, 2010.

KRUL, L.P.; YAKIMTSOVA, L.B.; EGOROVA, E.L.; MATUSEVICH, Yu.I.; SELEVICH, K.A.; KURTIKOVA, A.L. Preparation and Thermal Degradation of Methyl Methacrylate–Methacrylic Acid Copolymers. **Macromolecular chemistry and polymeric materials**, v.82, p.1636-1643, 2009.

LEE, S. C.; CHUANG, F. L.; TSAI, Y. L.; CHEN, H. Studies on the preparation and properties of sol-gel molecularly imprinted polymer based on tetraethoxysilane for recognizing sulfonamides. **Journal Polymers Research**, v. 17, p. 737-744, 2010.

LI, N.; NG, T.B.; WONG, J.H.; QIAO, J.X.; ZHANG, Y.N.; ZHOU, R.; RONG, CHEN, R.R.; LIU, F. Separation and purification of the antioxidant compounds, caffeic acid phenethyl ester and caffeic acid from mushrooms by molecularly imprinted polymer. **Food Chemistry**, v. 139, p. 1161–1167, 2013.

LI, T.J.; CHENA, P.Y.; NIENA,P.C.; LINA, C.Y.; VITTAL, R.; LINGB, T.R.; HOA,K.C. Preparation of a novel molecularly imprinted polymer by the sol–gel process for sensing creatinine. **Analytica Chimica Acta**, v. 711, p. 83– 90, 2012.

LI, Y.; DONG, F.; LIU, X.; XU, J.; LI, J.; KONG, Z.; CHEN, X.; LIANG, X.; ZHENG, Y. Simultaneous enantioselective determination of triazole fungicides in soil and water by chiral liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1224, p. 51–60, 2012.

MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers:new molecular recognition materials for selective solidphase extraction of organic compounds. **Fresenius Journal Analical Chemistry**, v. 370, p. 795-802, 2001.

MELO, J. O.F.; DONNICI, C. L.; AUGUSTI, R.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V.; FERREIRA, M. L. G.; CUNHA, A.C. Heterociclos 1,2,3-Triazólicos: Histórico, Método de Preparação, Aplicações e Atividades Farmacológicas. **Química Nova**, v. 29, p. 569-579, 2006.

MENCZEL, J.D.; PRIME, R.B. **Thermal analysis of polymers. Fundamentals and applications**. Canadá: John Wiley & Sons, 2009.

MENEZES FILHO, A. M.; SANTOS, F. N.; PEREIRA, P. A. P. Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC–MS) for the determination of pesticide residues in mangoes. **Talanta**, v. 81, p. 346–354, 2010.

MORAES, G.O.I.; DA SILVA, L.M.R.; DOS SANTOS-NETO, A.J.; FLORENZANO, F.H.; FIGUEIREDO, E.C. **Analical Bioanalitical Chemistry**, v. 24, p. 7687-7696, 2013.

NOUGADÈRE, A.; RENINGER, J.C.; VOLATIER, J.L.; LEBLANC, J.C. Chronic dietary risk characterization for pesticide residues: A ranking and scoring method integrating agricultural uses and food contamination data. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1484–1510, 2011.

PASSEPORT, E.; GUENNE, A.; CULHAOGLU, T.; MOREAU, S.; BOUYÉ, J.M.; TOURNEBIZE, J. Design of experiments and detailed uncertainty analysis to develop and validate a solid-phase microextraction/gas chromatography–mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 16 pesticides in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 5317–5327, 2010.

PAWLISZYN, J. **Handbook of solid phase microextraction**. Beijing: Chemical Industry Press of China, 2009.

PAWLISZYN, J. **Solid phase microextraction**. New York: Wiley-VCH, 1997.

PELAEZ, V.; TERRA, F. H. B.; SILVA, L. R. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. **Revista de Economia**, v. 36, p. 27-48, 2010.

PEREIRA, P. F.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 64, p. 1-15, 2009.

PICHON, V.; HUGON, C. F. Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants—A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 622, p. 48-61, 2008.

RIDGWAY, K.; LALLJIE, S. P.; SMITH, R. M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 36-53, 2007.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. **Suco de uva**. EMBRAPA- Informação Tecnológica, 2007. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/11888/2/00081370.pdf>> Acesso em: 13 de set. 2013.

SANG, Z. Y.; WANG, Y. T.; TSOI, Y. K.; LEUNG, K. S. Y. CODEX-compliant eleven organophosphorus pesticides screening in multiple commodities using headspace-solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 136, p. 710-717, 2013.

SCHREINEMACHERS, P.; TIPRAQSA, P. Agricultural pesticides and land use intensification in high, middle and low income countries. **Food Policy**, v. 37, p. 616-626, 2012.

SELLERGREN, B. **Molecularly Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies and their Application in Analytical Chemistry**, 1. ed. Germany: Elsevier, 2001.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7ª Ed. Editora LTC, 2006.

SKEVAS, T.; OUDE LANSINKET, A. G. J. M.; STEFANO, S. E. Designing the emerging EU pesticide policy: A literature review. **NJAS - Wageningen Journal Life Science** 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.njas.2012.09.001>>. Acesso em : 5 de maio 2013.

TAMAYO, F. G.; TURIEL, E.; ESTEBAN, A. M. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, p. 32-40, 2007.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, L. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros Biomiméticos em Química Analítica. Parte 1: Preparo e Aplicações de MIP (Molecularly Imprinted Polymers) em Técnicas de Extração e Separação. **Química Nova**, v. 28, p. 1076-1086, 2005.

TAXVIG, C., HASS, U., AXELSTAD, M., DALGAARD, M., BOBERG, J., ANDEASEN, H. & VINGGAARD, A. Endocrine-disrupting activities in vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. **Toxicology Science**, v.100, p. 464-473, 2007.

TOGUNDE, O.P.; KEN, HEART. L.; OAKES, K. D.; SERVOS, M.R, PAWLISZYN. Development and evaluation of a new in vivo solid-phase microextraction sampler. **Journal Separation Science**,v. 36, p. 219–223, 2013.

TOXNET (toxicology data network). Disponível em:< <http://toxnet.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 2 de maio 2013.

TURIEL, E.; ESTEBAN, A. M. Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 668, p. 87-99, 2010.

WANG, J.; DU, Z.; YU, W.; QU, S. Detection of seven pesticides in cucumbers using hollow fibre-based liquid-phase microextraction and ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1247, p. 10– 17, 2012.

WANG, Y.; DU, R. Simultaneous extraction of trace organophosphorous pesticides from plasma sample by automated solid phase extraction and determination by gas chromatography coupled with pulsed flame photometric detector. **Forensic Science International**, v. 198, p. 70-73, 2010.

WERF, H. M. G. Assessing the impact of pesticides on the environment. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 60, p. 81-96, 1996.

WINEFORDNER, J. D. **Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry**. v. 162, New Jersey:John Wiley & Sons, Inc., 2003.

YAQUB, S.; LATIF, U.; DICKERT, F. L. Plastic antibodies as chemical sensor material for atrazine detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 160, p. 227-233, 2011.

YIN, J.; YANG, G.; CHEN, Y. Rapid and efficient chiral separation of nateglinide and its l-enantiomer on monolithic molecularly imprinted polymers. **Journal of Chromatography A**, v. 1090, p. 68–75, 2005.

ZHANG, Z.; YANG, M. J.; PAWLISZYN, J. Solid-Phase Microextraction. A Solvent-Free Alternative for Sample Preparation. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 844A-853A, 1994.