Bruno Henrique Fumes

Avaliação do emprego da técnica MEPS na análise de agrotóxicos em caldo de cana-de-açúcar por GC-MS.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica
Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

SÃO CARLOS

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Fumes, Bruno Henrique

Avaliação do emprego da técnica MEPS na análise de agrotóxicos em caldo de cana-de-açúcar por GC-MS. / Bruno Henrique Fumes. — São Carlos, 2015. 83 f.

Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Carlos, 2015.
Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

1. Cromatografia a gás. 2. Microextração por sorvente empacotado (MEPS). 3. Caldo de cana-de-açúcar. 4. Resíduos de agrotóxicos. 5. Espectrometria de massas. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais Sônia e José Antônio, pelo amor, apoio e esforço incondicional para proporcionar a melhor educação a mim e meu irmão Mateus, meu melhor amigo. A minha namorada Flávia por todas as palavras de apoio, sua compreensão, carinho e pelos diversos momentos felizes que me proporciona.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar meus passos, me dar forças nos momentos de dificuldade e por me conceder sabedoria durante a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças por ter me recebido no grupo de cromatografia, pela orientação, ensinamentos, incentivo e oportunidades a mim concedidas durante a realização dessa dissertação, e por ter acreditado no meu potencial.

Aos meus pais que sempre me incentivaram, dando todo apoio necessário e por sempre acreditar que a educação é o maior legado que se pode deixar para um filho. E também a toda a minha família que de forma direta ou indireta contribui para minha formação.

Ao meu irmão Mateus por ser um grande amigo e sempre ter uma opinião divergente da minha fazendo com que eu sempre cresça no aspecto pessoal e profissional.

À minha namorada Flávia pelo carinho, felicidade que me proporciona e compreensão pelos momentos ausentes. E também a seus pais por todo apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto pelas sugestões e discussões realizadas muitas vezes no corredor do laboratório.

Aos amigos do CROMA Maraissa, Rodrigo, Meire, Felipe, Adriel, Rose, Letícia, Amanda, Pipe, Batiston, Scarlet, Arley, Tanare, Guilherme, Odete e Elaine pelas discussões sobre química, estatística ou política, pelos ensinamentos, churrascos, cafés e todos os momentos compartilhados que com certeza tornaram a realização desse trabalho mais prazeroso.

Aos amigos Fernando e Gabriel por terem me acolhido em sua casa durante os primeiros meses dessa jornada.

Aos professores Dr. Eduardo Bessa Azevedo pelas sugestões ao avaliar o projeto durante a disciplina Análise de Temas Avançados em Química, e ao Dr. Antonio Ricardo Zanatta pelas medidas de espectroscopia Raman realizadas no seu laboratório.

À FAPESP (processo 2013/17425-4) pela bolsa de pesquisa concedida, e também, a CAPES e CNPq por apoiar os projetos desenvolvidos no grupo.

“Pensar é o trabalho mais difícil que existe. Talvez por isso tão poucos se dediquem a ele.”

Henry Ford

RESUMO

O uso de técnicas miniaturizadas de preparo de amostra vem se tornando uma tendência cada vez mais crescente em química analítica. Dentre elas o MEPS (Microextraction by a Packed Sorbent) apresenta grande potencial por poder ser acoplado on-line, sem grandes modificações, à cromatografia gasosa e líquida, não necessitando de grande quantidade de tempo para análise e seu cartucho sorvente ser reutilizável. O uso de MEPS, foi mais explorado até o presente momento na análise de fármacos em fluídos biológicos; dessa forma existe um pequeno número de publicações que exploram o uso dessa técnica na determinação de agrotóxicos em matrizes de alimentos. Por esse motivo, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação do uso da técnica MEPS na determinação de seis agrotóxicos utilizados no cultivo da cana-de-açúcar (tebutiuram, carbofurano, atrazina, metribuzim, ametrina e bifentrina) em amostras de garapa.

Para o desenvolvimento desse estudo foram verificadas dentre as variáveis pH, força iônica, solvente de eluição e volume do solvente de eluição, quais poderiam afetar o desempenho da técnica em diferentes fases extratoras, empregando nessa etapa de otimização planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} . As fases avaliadas foram C18 Chromabond e HLB Oasis, assim como sistemas comercialmente disponíveis com as fases C18, C8, SAX, SCX e SIL. Durante essa etapa foi realizado um estudo inicial do uso do grafeno como material sorvente em MEPS, considerando as propriedades que esse material apresenta para atuar como adsorvente em técnicas de preparo de amostra. Contudo, o uso do grafeno apresentou entupimento no cartucho de sorção, problema ainda em avaliação.

A fase C18 Chromabond foi a que apresentou os melhores resultados, sendo a escolhida para otimização dos parâmetros envolvidos na etapa de extração por MEPS. Os parâmetros otimizados por planejamento fatorial 2^3 foram os ciclos de: aspiração da amostra, lavagem e eluição. O método desenvolvido foi validado baseado nos critérios exigidos pelo MAPA e apresentou seletividade, linearidade e os limites de quantificação variaram de 2-10 µg/L. A recuperação foi adequada para todos os analitos (71,7-106,9%), assim como a precisão intra e inter-dia que apresentou coeficientes de variação (CV) menores que 16%. O método desenvolvido foi aplicado em quatro amostras reais de garapa de diferentes regiões.

ABSTRACT

The use of miniaturized techniques in sample preparation has becoming a growing trend in analytical chemistry. Among these techniques MEPS (Microextraction by a Packed Sorbent) presents a great potential affording on-line coupling, without much modification to gas and liquid chromatography systems, in addition it does not require large analyses time and the sorbent cartridge is reusable. MEPS utilization has been explored mainly for drugs analyses in biological fluids, existing limited number of publications that apply this technique for pesticides analyses in food sample matrix. For this reason the goal of present work was the evaluation of MEPS in the analyses of six pesticides used in sugarcane cultivation (tebuthiuron, carbofuran, atrazine, metribuzine, ametryn and bifenthrin) in sugarcane juice samples.

During the method development several variables were evaluated including pH, ionic strength, elution solvent and solvent volume, to determine which ones could affect the technique perform in different sorbent phases. For this optimization step, fractional factorial design 2^{4-1} was utilized. Phases evaluated included C18 Chromabond and HLB Oasis, and also commercially available system containing C18, C8, SAX, SCX e SIL. During this step, it was also carried out an initial study employing graphene in a MEPS system; Taking into account the properties that this material presents to act as adsorbent in sample preparation techniques. However the graphene showed obstruction problems in the sorption cartridge, whose solution is under way.

The phase C18 Chromabond showed better results, and was chosen to MEPS parameters optimization. MEPS parameters were optimized by full factorial design 2^3 were the following cycles: sample aspiration, washing and elution. The method, was validated based upon the MAPA requirements and showed good selectivity, linearity and quantifications limits ranging from 2-10 $\mu\text{g/L}$. Recovery was satisfactory for all pesticides (71,7-106,9%), intra- and inter-day precision were satisfactory and showed coefficients of variation (CV) less than 16%. Hence, the developed method was applied to the analysis of four real samples of sugarcane juice obtained from different regions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplo de um processo completamente automatizado de MEPS.....	19
Figura 2 - Sistemas de MEPS comercialmente disponíveis. Sistema manual (Hamilton), Semiautomático (eVol) e Automático (on-line). Os cartuchos de sorção, são também comercialmente conhecidos como BIN (Barrel Insert and Needle).....	20
Figura 3 - Esquema de uma síntese do grafeno partindo do grafite.....	23
Figura 4 - Origem dos espectros Raman. Em (a) a radiação é incidida na mostra e produz espalhamento em todos os ângulos, devido a excitação de $u = 0$ ou $u = 1$ a um nível virtual j , seguida de uma reemissão de um fóton de energia menor (Stokes) ou maior (Anti-Stokes). Na figura (b) é possível observar o espalhamento de frequências mais baixas (Stokes) e os de frequências mais altas (Anti-Stokes). A intensidade das linhas Stokes é maior, pois geralmente os nível $u = 0$ é mais densamente populado que o nível $u = 1$.	24
Figura 5 – Estrutura dos agrotóxicos utilizados no desenvolvimento do método.	30
Figura 6 - Cromatograma de massas (GC-MS) obtido da injeção de 1 μ L dos padrões dos analitos de interesse na concentração de 0,5 mg/L .	44
Figura 7 - Difractogramas do grafite, óxido de grafite e grafeno.	45
Figura 8 - Espectro Raman com laser de emissão em 488nm do grafite, óxido de grafeno e grafeno.	46
Figura 9 - Fatorial Fracionário 2^{4-1} utilizando C18 (Cromabond) como fase extratora, e agrotóxicos na concentração de 0,4 mg L ⁻¹	48
Figura 10 - Fatorial Fracionário 2^{4-1} utilizando HLB Oasis da Waters como fase extratora, e agrotóxicos na concentração de 0,4 mg L ⁻¹ .	49
Figura 11 - Fatorial Fracionário 2^{4-1} utilizando C18 da SGE Analytical Science como fase extratora, e agrotóxicos na concentração de 0,4 mg L ⁻¹ .	50
Figura 12 - Fatorial Fracionário 2^{4-1} utilizando C8 da SGE Analytical Science como fase extratora, e agrotóxicos na concentração de 0,4 mg L ⁻¹ .	51
Figura 13 - Fatorial Fracionário 2^{4-1} utilizando SCX da SGE Analytical Science como fase extratora, e agrotóxicos na concentração de 0,4 mg L ⁻¹ .	52
Figura 14 - Fatorial Fracionário 2^{4-1} utilizando SAX da SGE Analytical Science como fase extratora, e agrotóxicos na concentração de 0,4 mg L ⁻¹ .	53
Figura 15 - Fatorial Fracionário 2^{4-1} utilizando SIL da SGE Analytical Science como fase extratora, e agrotóxicos na concentração de 0,4 mg L ⁻¹ .	54
Figura 16 - Comparação entre as fases extradoras, utilizando as mesmas condições de extração em uma amostras de garapa fortificada com 0,4 mg L ⁻¹ dos agrotóxicos em estudo.	57
Figura 17 - Comparação entre C18 (Chromabond) e uma mistura de fases na composição de 10% de grafeno (G) e 90% C18 (Chromabond), variando os ciclos de aspiração da amostra em 3 e 6 vezes, simbolizados por (3x) e (6x) respectivamente. Extração de água destilada fortificadas com os agrotóxicos em estudo na concentração 0,2 mg L ⁻¹ .	59
Figura 18 - A) Modelo de nanofolhas de óxido de grafeno (GO) e grafeno (G). A parte sombreada indica a presença de grupos polares. B) Rota sintética para síntese de GO@silica e G@silica. NP-SPE = SPE em fase normal, RP-SPE = SPE em fase reversa.	59
Figura 19 - Comparação entre a área obtida para cada agrotóxico utilizando diferentes volumes do solvente de eluição para a fase C18 Chromabond.	60
Figura 20 - Diagrama de pareto fatorial completo 2^3 com ponto central, otimização dos ciclos de: aspiração da amostra, lavagem e eluição.....	61
Figura 21 - Superfícies de respostas obtidas, através do planejamento experimental 2^3 .	63
Figura 22 - Cromatogramas representativos dos agrotóxicos em estudo da garapa sem fortificação (branco) e fortificada na concentração do LOQ.	65

Figura 23 - Gráficos de resíduos x concentração dos analitos em estudo. À esquerda gráficos do modelo sem ponderação; a direita os gráficos do modelos ponderados que apresentaram melhora na soma dos resíduos e no R^2 . (continua)	67
Figura 24 - Curvas de calibração dos melhores modelos ponderados.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - LMRs permitidos pela ANVISA para os agrotóxicos em estudo na cultura de cana-de-açúcar.	17
Tabela 2 - Exemplos de fontes de laser utilizadas na espectroscopia Raman.	25
Tabela 3 - Matriz de um fatorial fracionário 2^{4-1}	28
Tabela 4 - Níveis das variáveis avaliadas no experimento fatorial 2^{4-1}	35
Tabela 5 - Valores de pKa e do logaritmo do coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow}$) dos agrotóxicos estudados.	36
Tabela 6- Níveis das variáveis avaliados na otimização da extração por MEPS.	37
Tabela 7 - Valores de concentração utilizados na avaliação da linearidade.	39
Tabela 8 - Níveis de concentração utilizados na avaliação da recuperação.	41
Tabela 9 - Íons monitorados após a separação cromatográfica dos analitos de interesse e seus respectivos tempos de monitoramento.	43
Tabela 10 - Variáveis com efeitos significativos no experimento fatorial fracionário 2^{4-1} , levando em consideração a fase extratora utilizada e o agrotóxico. A numeração das variáveis segue a relação: (1) pH, (2) força iônica % (m/v), (3) solvente de eluição e (4) volume do solvente de eluição.	55
Tabela 11 - Parâmetros da extração por MEPS utilizados na etapa de validação.	64
Tabela 12 - Avaliação do efeito de matriz. Quanto menor o valor da tabela, maior a contribuição do efeito matriz para o composto.	66
Tabela 13 - Soma dos resíduos (%), teste F e faixa linear de trabalho. Dados usados na avaliação da homocedasticidade do modelo linear sem ponderação.	67
Tabela 14 - Soma dos resíduos (%), coeficientes angular (b), linear (a) e de determinação (R^2) das calibrações ponderadas e da não ponderada. (continua)	69
Tabela 15 - Resultados de recuperação/veracidade e da eficiência do processo de extração	73
Tabela 16 - Precisão expressa pelo coeficientes de variação (CV) intra e inter-dia.	74
Tabela 17 - Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)	75
Tabela 18 - Limites de detecção (LOD) encontrados na literatura de agrotóxicos em garapa.	75
Tabela 19 – Resíduos de agrotóxicos encontrados nas amostras de garapas analisadas.	76

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BIN – “Barrel Insert and Needle”

Conab - Companhia Nacional de Abastecimento

CV – Coeficiente de Variação

DMF - N,N di-metilformamina

GC-MS – Cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas

HPLC-UV – Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por absorção no ultravioleta

HS-SPME – microextração em fase sólida no modo “head-space”

IFSC – Instituto de Física de São Carlos

Labex – Laboratório de Bioquímica do Exercício do Instituto de Biologia da Unicamp, da Faculdade de Engenharia de Alimentos

LC-ESI-MS/MS – Cromatografia líquida com ionização por electrospray e detecção por massa em “tandem”.

LMR – Limite máximo de resíduo

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

LVI – “Large volume injection”

MAPA – Ministério da Agricultura e Pecuária

MASE - Extração com solvente assistida por membrana

MEPS – microextração por sorvente empacotado

MIP – Polímero molecularmente impresso

MRC – Material de referência certificado

MSPD - Dispersão de matriz em fase sólida

PDMS – Dimetil polissiloxano

PFD - p-fenileno diamina

QuEChERS - Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe

RAM – Material de acesso restrito

RSD - Desvio padrão relativo

SBSE – Extração sortiva em barra de agitação

SIM – “Selected ion monitoring”

SPE – extração em fase sólida

SPME – micro extração em fase sólida

TD – Dessorção térmica

XRD – Difração de raios-x

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Cana-de-açúcar e caldo de cana (garapa)	15
1.2 Agrotóxicos.....	16
1.3 Técnicas miniaturizadas de preparo de amostra.....	17
1.4 MEPS	18
1.5 Materiais utilizados como fase extratora em MEPS	21
1.6 Grafeno	21
1.7 Difração de raios-X.....	23
1.8 Espectroscopia Raman	24
1.9 Otimização das Variáveis Experimentais	25
1.9.1 Planejamento Experimental.....	26
1.9.2 Planejamento Fatorial Completo 2^k	27
1.9.3 Planejamento Fatorial Fracionário 2^{k-n}	27
2 OBJETIVOS	29
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	30
3.1 Reagentes e padrões	30
3.2 Materiais.....	31
3.3 Equipamentos	31
3.4 Métodos.....	32
3.4.1 Preparo das soluções estoque de padrões	32
3.4.2 Preparo das amostras de garapa	32
3.4.3 Condições cromatográficas	32
3.4.4 Síntese do grafeno	33
3.4.5 Caracterização do grafeno	34
3.4.6 Planejamento experimental fatorial fracionário 2^{4-1}	34
3.4.7 Otimização univariada do volume de eluição	36
3.4.8 Otimização da extração do MEPS por planejamento fatorial 2^3	37
3.4.9 Validação.....	37
3.4.9.1 Seletividade (interferentes).....	38

3.4.9.2 Efeito Matriz	38
3.4.9.3 Linearidade.....	38
3.4.9.4 Recuperação/Veracidade (exatidão) e eficiência do processo de extração	40
3.4.9.5 Precisão (repetitividade).....	42
3.4.9.5 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ).....	42
3.4.9.6 Robustez	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1 Separação cromatográfica	43
4.2 Caracterização do Grafeno	44
4.2.1 Difração de Raio-X	44
4.2.2 Espectroscopia Raman	46
4.3 Planejamento Experimental Fatorial Fracionário 2^{4-1}	47
4.4 Comparação entre as fases extratoras	56
4.5 Avaliação do grafeno como sorvente em MEPS	57
4.6 Otimização do volume de eluição do métodos	60
4.7 Otimização da extração do MEPS por planejamento experimental Fatorial 2^3 ..	60
4.8 Validação.....	64
4.8.1 Seletividade (interferentes).....	64
4.8.2 Efeito Matriz	66
4.8.3 Linearidade.....	66
4.8.3 Recuperação/veracidade (exatidão) e eficiência do processo de extração.....	72
4.8.4 Precisão (Repetitividade)	73
4.8.5 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ).....	74
4.8.6 Robustez	76
4.9 Aplicação do método em amostras reais de garapa	76
5 CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS.....	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cana-de-açúcar e caldo de cana (garapa)

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar; dela derivam produtos como a rapadura, açúcar, etanol, e cachaça. Por isso, a cana-de-açúcar ocupa posição de destaque no agronegócio nacional e internacional. Segundo levantamento feito pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), no primeiro semestre de 2014 a produção da safra 2013-2014 chegou a 658 milhões de toneladas, um aumento de 11,9% em relação à safra anterior. Para a safra 2014-2015 a previsão é de uma produção próxima à de 2013-2014, mesmo com as condições climáticas desfavoráveis em algumas regiões, ocorreu um aumento nas áreas de plantio da cana-de-açúcar, justificando a estabilidade na produção.¹

A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum* L. e é composta por água (65-75%), açúcares (11-18%), sólidos solúveis (12-23%) e fibras 8-14%). Dos açúcares a sacarose está presente em maior quantidade (70-90%), seguido da glicose e frutose (2-4% cada um).²

O caldo de cana (garapa) é um líquido extraído na moagem da cana-de-açúcar, sendo uma bebida tipicamente brasileira e encontrada, geralmente, em barracas de feiras livres, mercados populares, etc. É um alimento extremamente nutritivo, pois é rico em carboidratos e minerais (ferro, cálcio, fósforo, potássio, sódio e magnésio),² além de possuir antioxidantes como ácidos fenólicos e flavonoides.³

Em 2004 foi estudado o uso da garapa como suplemento para atletas no Laboratório de Bioquímica do Exercício (Labex), do Instituto de Biologia da Unicamp, e do Departamento de Alimentos e Nutrição, da Faculdade de Engenharia de Alimentos. A pesquisa foi aplicada em jogadores de futebol e apresentou resultados positivos em relação ao bom desempenho físico e recuperação muscular dos atletas.⁴

Na literatura existem poucos trabalhos que exploram o desenvolvimento de métodos para determinação dos agrotóxicos utilizados na cultura da cana-de-açúcar em amostras de garapa. Sampaio et al.⁵ exploram o uso de QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) como técnica de extração, seguida por um

sistema de quantificação que acoplava cromatografia líquida com detector de massas em “tandem” e ionização por “electrospray” (LC-ESI-MS/MS). Os limites de quantificação encontrados foram de 0,83-16 $\mu\text{g.L}^{-1}$, recuperação entre 75-120%, com desvio padrão relativo (RSD) de 20%. Tseng et al.⁶ determinaram resíduos de simazina em cana-de-açúcar realizando a extração/concentração da amostra por dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) e separação por cromatografia líquida com detector de ultravioleta (HPLC-UV) em 230nm. Os valores de recuperação foram na faixa de 87-95%. Zuin et al.⁷ compararam duas técnicas: a extração com solvente assistida por membrana (MASE) com extração por sorção em barra de agitação (SBSE) para extração de 18 resíduos de agrotóxicos em garapa, usando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Barletta et al.⁸ desenvolveram um método também utilizando SBSE com GC-MS para determinar 6 resíduos de agrotóxicos em garapa, os mesmos que foram utilizados nesse trabalho (tebutiuram, carbofurano, atrazina, ametrina, metribuzim e bifentrina).

1.2 Agrotóxicos

Agrotóxicos são compostos químicos utilizados na agricultura para o controle de insetos, fungos, ervas daninhas e vários tipos de pragas. Esses compostos também são conhecidos como agroquímicos, pesticidas, defensivos agrícolas ou praguicidas. Devido ao grande crescimento populacional, a demanda por alimentos vem aumentando tornando, cada vez mais, necessária a utilização desses agentes. Segundo dossiê publicado pela Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO), nos últimos dez anos, enquanto o uso mundial de agrotóxicos cresceu 93%, o Brasil registrou aumento de 190%.^{9, 10}

Apesar de terem efeito benéfico no controle de pragas em plantações, o uso de agrotóxicos pode deixar resíduos desses compostos químicos em produtos alimentares como, por exemplo, os derivados da cana-de-açúcar. Esses resíduos são potencialmente prejudiciais para a saúde humana e podem causar impactos no organismo humano devido à toxicidade aguda e crônica desses compostos.¹¹ Um desses efeitos pode ser a desregulação endócrina causada por atrazina, bifentrina, e carbaril.¹² Os agrotóxicos interagem com receptores hormonais nucleares, podendo

afetar o sistema endócrino de reprodução do organismo humano. Os efeitos crônicos dos resíduos de agrotóxicos provenientes de alimentos ainda não são bem caracterizados, porém já tem sido observado um aumento na genotoxicidade e carcinogenicidade no organismo humano.¹³

Por isso, tem se tornado cada vez mais importante o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de detectar concentrações na faixa de $\mu\text{g.L}^{-1}$ e ng.L^{-1} para que os limites máximos de resíduos (LMR) permitidos sejam detectados. De acordo com a legislação vigente no Brasil o LMR de agrotóxicos em cana-de-açúcar deve ser estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); no entanto não há no país legislação específica para alimentos derivados da cana-de-açúcar. A Tabela 1 mostra o LMR dos agrotóxicos em estudo permitidos pela ANVISA para o cultivo de cana-de-açúcar.¹⁴

Tabela 1 - LMRs permitidos pela ANVISA para os agrotóxicos em estudo na cultura de cana-de-açúcar.

Agrotóxico	LMR(mg/kg)
Tebutiuram	1
Carbofurano	0,1
Atrazina	0,25
Metribuzim	0,1
Ametrina	0,05
Bifentrina	0,02

Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).¹⁴

1.3 Técnicas miniaturizadas de preparo de amostra

Atualmente as técnicas miniaturizadas de preparo de amostra vêm ganhando destaque, pois não necessitam de grandes quantidades de amostras, ao mesmo tempo em que utilizam menor volume de solvente do que os métodos convencionais para realizar a extração/concentração da amostra.¹⁵ Dentre essas técnicas se sobressaem a microextração em fase sólida (SPME), tanto no modo direto quanto

no “Head-Space” (HS-SPME), a extração sortiva em barra de agitação (SBSE) e a microextração por sorvente empacotado (MEPS).

A SPME foi desenvolvida por Pawliszyn et al.¹⁶ em 1990 e pode ser utilizada no modo direto ou em “Head-Space”. As vantagens dessa técnica são o baixo consumo de solvente, portabilidade, boa precisão, baixos limites de detecção, possibilidade de acoplamento on-line e sua simplicidade. A SPME tem sido aplicada em diversos campos como, por exemplo, análise de fármacos¹⁷ e agrotóxicos¹⁸, em matrizes de alimentos¹⁹ e ambientais,²⁰ dentre outras aplicações.

A SBSE foi desenvolvida por Baltussen et al.²¹; essa técnica utiliza uma barra de agitação magnética revestida com o material de sorção, sendo o mais comum o polidimetilsiloxano (PDMS). A SBSE é considerada uma derivação da SPME, e por isso, os mecanismos de extração e as vantagens são similares tanto no modo direto como no “Head-Space”. A maior diferença entre essas duas técnicas está no volume da fase extratora que na SBSE pode ser de 50-250 vezes maior que na SPME, resultando em valores mais altos de recuperação.²² Os campos de aplicações da SBSE são similares ao da SPME.²²

Dentre essas técnicas de extração, a MEPS é a que apresenta, até o momento, o menor número de publicações, sendo a maior parte delas para análise de fármacos em fluídos biológicos. A sua exploração em matrizes de alimentos foi menor até o presente momento e, o que motivou o interesse pelo desenvolvimento de um método para analisar agrotóxicos em garapa empregando essa técnica.

1.4 MEPS

A técnica MEPS foi desenvolvida por Abdel-Rehim, sendo, inicialmente aplicada na determinação de anestésicos em plasma sanguíneo humano.²³ Essa técnica utiliza os mesmos materiais sorventes que a extração em fase sólida convencional (SPE), e pode ser considerada sua miniaturização, por necessitar de menores quantidades de amostra, solvente de eluição e material sorvente (1-10 mg), além de permitir a realização de vários ciclos de aspiração, lavagem e de eluição (dessorção) da amostra. O MEPS também pode ser acoplado on-line à

cromatográfica líquida e gasosa, e o cartucho de sorção pode ser utilizado por mais de 100 vezes, dependendo da natureza da matriz de interesse.^{23, 24}

A Figura 1 exemplifica um processo completamente automatizado de MEPS e suas etapas envolvidas. Deve-se ressaltar que antes da etapa de aspiração da amostra é necessária a realização de uma etapa de condicionamento/regeneração da fase extratora. O condicionamento é realizado antes da primeira utilização do material sorvente, e a regeneração, no caso dele já ter sido usado anteriormente. Depois da etapa de lavagem (etapa 2) pode-se, dependendo da necessidade do método, optar por uma etapa de secagem da fase extratora, que consiste na aspiração de ar na seringa.

As principais aplicações de MEPS, até o momento, envolvem em grande parte a determinação de fármacos em amostras biológicas.^{24, 25} Porém, também há na literatura o relato de outras aplicações como a determinação de carbamato de etila em vinho,²⁶ de compostos responsáveis pelo sabor e odor indesejável (cork-tain) do vinho,²⁷ policíclicos aromáticos em amostra de água²⁸, multiresíduos de agrotóxicos em mel²⁹ e, mais recentemente triazinas, em milho.³⁰

Figura 1 – Exemplo de um processo completamente automatizado de MEPS.

FONTE: Adaptado de ABDEL-REHIM, M. New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications. **Journal of Chromatography B**, v. 801, n. 2, p. 317-321, 2004.²¹

No desenvolvimento de um método que utilize essa técnica, é necessário à avaliação das seguintes variáveis: pH; força iônica do meio; solvente de eluição (dessorção) e seu volume, além do número de ciclos de aspiração, lavagem e eluição da amostra. Esses parâmetros foram descritos por Abdel-Rehim,³¹ como variáveis que podem afetar o desempenho do MEPS.

O MEPS pode ser utilizado no modo “on-line” e “off-line”. No modo “on-line” o processo de extração e injeção são realizados por um “autosampler”. No modo “off-line” a extração é manual e só então segue para injeção no sistema cromatográfico. O maior número de publicações dessa técnica relata o uso do sistema manual (off-line). Recentemente um sistema semiautomático foi introduzido pela SGE e Thermo Fisher Scientific, o que é um avanço para o desenvolvimento de métodos utilizando MEPS, por tornar os resultados mais confiáveis e reprodutíveis. A Figura 2 representa os sistemas atualmente disponíveis.³²

Figura 2 - Sistemas de MEPS comercialmente disponíveis. Sistema manual (Hamilton), Semiautomático (eVol) e Automático (on-line). Os cartuchos de sorção, são também comercialmente conhecidos como BIN (Barrel Insert and Needle).

FONTE: Adaptado de PEREIRA, J.; GONÇALVES, J.; ALVES, V.; CÂMARA, J. S. Microextraction using packed sorbent as an effective and high-throughput sample extraction technique: Recent applications and future trends. **Sample Preparation**, v. 1, p. 38-53, 2013.³²

1.5 Materiais utilizados como fase extratora em MEPS

Os materiais sorventes utilizados em MEPS podem ser os mesmos da SPE convencional como sílica com a superfície modificada (C2, C8, C18), trocadores iônicos, materiais de acesso restrito (RAM), copolímeros e polímeros molecularmente impressos (MIP). Também existem estudos sobre a aplicação de outros materiais em MEPS. Entre os materiais estudados até o momento, são encontrados nanofios de polianilina,³³ nanofibras de polipirrol/polianilina³⁴ e nanocompósitos de polidifenilamina.³⁵ Além dos materiais citados, outros podem ser explorados como, por exemplo, o grafeno. Contudo, é necessária uma avaliação e comparação cuidadosa com materiais disponíveis comercialmente para se verificar até que ponto sua utilização pode ser vantajosa. Desse modo nesse trabalho foi feita uma avaliação inicial da aplicação de grafeno como material sorvente em MEPS.

1.6 Grafeno

O grafeno é um material que, recentemente, começou a ser utilizado no preparo de amostras, devido a suas propriedades como a grande área superficial, boa estabilidade térmica, química e mecânica, podendo ser produzido a um baixo custo. Em teoria, essa forma alotrópica do carbono apresenta boas propriedades para atuar como material adsorvente, o que faz dele um material com excelente potencial para ser utilizado em microtécnicas de extração.³⁶

Alguns estudos já utilizaram o grafeno como revestimento em fibras de SPME na análise de piretróides,³⁷ organoclorados,³⁸ triazinas,³⁹ além de também já ter sido utilizado para “cleanup” de amostras de pepino e espinafre.⁴⁰ Liu et al.⁴¹ sintetizaram grafeno diretamente em grafite de lapiseira e o utilizaram como fibras de SPME na determinação de quatro análogos do bisfenol; a grande vantagem nesse caso foi o baixo custo de produção das fibras. Outra aplicação foi feita por Luo et al.⁴² utilizando SBSE com revestimento de grafeno, na extração de policíclicos aromáticos em amostras de água.

Os atrativos de se empregar o grafeno como adsorvente em relação a outras formas alotrópicas do carbono como, por exemplo, os nanotubos de carbono e fulereno são listados a seguir: ⁴³

- ✓ O grafeno possui elevada área superficial (2630 m²/g); isso sugere uma elevada capacidade de adsorção, graças a sua morfologia de nanofolhas em que ambos os lados estão disponíveis para adsorção.
- ✓ Sua síntese não exige aparelhagem sofisticada e pode ser realizada a um baixo custo, não necessitando de catalizadores facilitando a obtenção de um material puro.
- ✓ O sistema de elétrons- π deslocalizados permite uma forte interação com estruturas que possuem anéis benzênicos, como é o caso de poluentes, fármacos e biomoléculas. Para outros analitos o grafeno pode fornecer outros sítios para manipulação devido a sua grande área superficial. Sua funcionalização pode ser realizada através do óxido de grafeno, precursor do grafeno.
- ✓ As folhas do grafeno são relativamente flexíveis, portanto aderem mais facilmente a suportes que nanotubos de carbono e fulereno.

Existem diversas rotas sintéticas para a obtenção do grafeno através do grafite. Nessas sínteses o primeiro passo é oxidar o grafite a óxido de grafite, o que pode ser feito pelos métodos de Staudenmaier, Hummers e Brodie.⁴⁴ O método de Hummers ⁴⁵ é o mais utilizado para esse fim devido a sua simplicidade; após a obtenção do óxido de grafite ele é convertido em óxido de grafeno, processo que pode ser feito por uma esfoliação química, seguida da redução do óxido de grafeno ao grafeno propriamente dito. Gengler et al.⁴⁴ as exemplificam em seu trabalho de revisão sobre rotas de síntese do grafeno, além de sugerir outras rotas sintéticas para obtenção desse material. A Figura 3 mostra um esquema de rota sintética. ⁴³

Para realizar a caracterização do grafeno, alguns trabalhos que fazem aplicação em microtécnicas de extração, utilizam principalmente a difração de raios-x e espectroscopia Raman. ^{38, 41} Neste trabalho foram utilizadas essas mesmas técnicas para caracterizar o grafeno sintetizado.

Figura 3 - Esquema de uma síntese do grafeno partindo do grafite.

Fonte: Adaptado de LIU, Q.; SHI, J.; JIANG, G. Application of graphene in analytical sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 37, p. 1-11, 2012.⁴³

1.7 Difração de raios-X

A difração de raios-x é uma técnica muito utilizada na caracterização de materiais, pois com esse método é possível identificar a composição química e as posições atômicas das amostras investigadas. Além disso, podem ser obtidas outras informações como as tensões na sua rede cristalina e, também, identificar as fases cristalinas nela presentes.

O fenômeno de difração utiliza a lei de Bragg (Equação 1). O funcionamento simplificado de um difratômetro de raios-x ocorre da seguinte forma: um feixe de raios-x incide sobre o material em estudo e se detecta o feixe de raios que emerge desse material. Ao interagir com a estrutura atômica da amostra, o feixe é difratado pelos seus átomos. Como resultado, as várias direções em que os raios-x emergem do material carregam diversas informações sobre a estrutura atômica do mesmo, que são de grande importância para sua completa caracterização.⁴⁶

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (\text{Eq. 1})$$

n = número inteiro;

λ = comprimento de onda do feixe de raios-X incidente;

d = distância entre camadas atômicas em um cristal;

Θ = ângulo difratado

1.8 Espectroscopia Raman

O Raman é uma técnica de espectroscopia vibracional, assim como o infravermelho, que fornece características vibracionais fundamentais das moléculas que são usadas na elucidação de estruturas. A origem dos espectros Raman é exemplificada na Figura 4;⁴⁶ nela são representados os espalhamentos Stokes e Anti-Stokes. Quando a radiação espalhada é de frequência menor do que a de excitação recebe a denominação de Stokes. A radiação espalhada de frequência maior do que a da fonte de radiação recebe o nome de espalhamento anti-Stokes.

Figura 4 - Origem dos espectros Raman. Em (a) a radiação é incidida na mostra e produz espalhamento em todos os ângulos, devido a excitação de $u = 0$ ou $u = 1$ a um nível virtual j , seguida de uma reemissão de um fóton de energia menor (Stokes) ou maior (Anti-Stokes). Na figura (b) é possível observar o espalhamento de frequências mais baixas (Stokes) e os de frequências mais altas (Anti-Stokes). A intensidade das linhas Stokes é maior, pois geralmente os nível $u = 0$ é mais densamente populado que o nível $u = 1$.

Na espectroscopia Raman a excitação espectral é realizada normalmente por radiação com comprimento de onda bem distante de qualquer banda de absorção da amostra de interesse. Por esse motivo, a utilização dessa técnica como ferramenta auxiliar de caracterização de compostos derivados do carbono utilizam laser na faixa de 488 nm.⁴⁷ A Tabela 2 exemplifica outras fontes de laser monocromático utilizados na espectroscopia Raman.

Tabela 2 - Exemplos de fontes de laser utilizadas na espectroscopia Raman.

Tipo de laser	λ(nm)
Íon Argônio	488
Íon Criptônio	530,9
Hélio-neônio	632,8
Diodo	785
Nd-YAG	1064

Fonte: HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental** 6ª ed. Porto Alegre: BOOKMAN, 2009. 1056p.⁴⁶

1.9 Otimização das Variáveis Experimentais

No desenvolvimento de métodos analíticos, diversos fatores podem influenciar a obtenção de bons resultados. Para se obter as melhores condições de concentração utilizando MEPS, é necessário efetuar-se uma otimização de variáveis como: força iônica do meio, pH, tipo do solvente de eluição, volume do solvente, além dos ciclos de aspirações, lavagem e eluição da amostra. A otimização desses parâmetros visa obter maior sensibilidade e seletividade do método. Para isso pode-se utilizar técnicas de planejamentos fatoriais completos ou fracionários e, também, a metodologia de superfície de resposta.

1.9.1 Planejamento Experimental

Para otimizar um método analítico é necessário investigar quais são as variáveis, também chamadas de fatores, que afetam a resposta de interesse. Isso pode ser feito com auxílio de técnicas univariadas ou multivariadas.

A primeira requer um grande número de experimentos para chegar a uma condição ótima, pois cada variável é modificada em um experimento enquanto as outras permanecem fixas. Por isso apresenta desvantagens como elevado consumo de matéria prima, desperdício de tempo e despreza a interação entre as variáveis. Já as técnicas de otimização multivariadas necessitam de um menor número de experimentos para alcançar a condição ótima, pois todas as variáveis são variadas ao mesmo tempo, o que possibilita avaliar efeitos de dois tipos: efeitos principais, que se referem apenas a uma variável quando seus níveis são alterados, e efeitos de interação entre variáveis, podendo esta interação ser de segunda ordem ou superior.^{48, 49}

Dentre as técnicas multivariadas, destaca-se o uso de planejamentos fatoriais que podem ser completos ou fracionários, dependendo da disponibilidade de material, tempo, complexidade do experimento e, principalmente, do número de variáveis a serem investigadas. Vale ressaltar que em planejamentos fatoriais é importante que os testes sejam realizados de forma aleatória.⁴⁹ A randomização é importante, pois outros fatores como, por exemplo, mal funcionamento do equipamento e erros operacionais, que não estão sendo testados, podem influenciar na resposta. Randomizar um experimento não evita complicações, porém, o protege de tendências geradas no decorrer do experimento, conforme o nível das variáveis é alterado.

As variáveis em planejamentos fatoriais completos ou fracionários podem ser de dois tipos, qualitativas ou quantitativas. O tipo de catalisador usado em uma reação, o solvente de eluição utilizado em uma técnica de extração e a marca de um reagente, são exemplos de variáveis qualitativas que podem ter seus efeitos estudados em um planejamento experimental. Já na classe de variáveis quantitativas, encontra-se, por exemplo, a temperatura, pH e velocidade de agitação de uma reação.

1.9.2 Planejamento Fatorial Completo 2^k

Um experimento fatorial completo inclui todas as combinações das variáveis de interesse e seus efeitos na resposta. Ele avalia as variáveis em dois níveis, um baixo (-1) e um alto (+1), também notadas somente pelos sinais negativo (-) e positivo (+) respectivamente. Um experimento fatorial 2^3 , por exemplo, requer um número de experimentos igual a: $2 \times 2 \times 2 = 8$.

Por isso, o número de experimentos necessários para se realizar uma replicata completa aumenta em progressão geométrica com o valor de k . Assim, em alguns casos, opta-se por realizar apenas uma fração do planejamento, o que é denominado fatorial fracionário.

1.9.3 Planejamento Fatorial Fracionário 2^{k-n}

A realização de planejamentos fatoriais completos com $k \geq 5$ (dependendo do caso) aumenta o consumo de tempo e matéria prima, entre outras coisas. Nesses casos, a utilização de um planejamento fatorial fracionário torna possível a análise das variáveis isoladas e interações entre elas que mais afetam a resposta, com a realização de apenas uma fração do experimento. Assim, em um planejamento 2^{k-1} apenas meia fração dos ensaios é realizada, e em um fatorial do tipo 2^{k-2} apenas um quarto.

Porém, essa redução no número de experimentos não acontece sem nenhuma perda. Por exemplo, a construção de uma meia fração de um planejamento 2^{4-1} ocorre da seguinte maneira: constrói-se um planejamento 2^3 completo para as variáveis 1, 2 e 3 e se atribui a variável 4 os sinais do produto das colunas 1, 2 e 3.

⁴⁸ A Tabela 3 representa a matriz deste planejamento com os ensaios a serem realizados em ordem aleatória.

Ao atribuir os sinais da variável 4 pelo modo exposto, os contrastes (I) I_{123} e I_4 ficam idênticos, uma vez que serão determinados pelos mesmos sinais. Por isso, na linguagem estatística se diz que a meia fração confunde o efeito principal na resposta da variável 4 com a interação 123. Dessa forma, o valor do contraste I_4

Tabela 3 - Matriz de um fatorial fracionário 2^{4-1} .

Ordem do Ensaio	1	2	3	4=123
6	-	-	-	-
16	+	-	-	+
1	-	+	-	+
10	+	+	-	-
11	-	-	+	+
5	+	-	+	-
2	-	+	+	-
9	+	+	+	+

(ou então I_{123}) calculado é uma soma dos efeitos causados pela variável 4 e interação entre as variáveis 123.

Um conceito importante na resolução de experimentos fatoriais fracionários é a mistura dos efeitos das variáveis principais com a interação entre variáveis, por exemplo: ⁴⁸

- ✓ Na fração 2^{4-1} os contrastes não misturam os efeitos das variáveis principais com a interação entre duas variáveis, mas os efeitos principais se misturam com interações de três variáveis, que devem ser menos significativas.
- ✓ A fração 2^{5-1} confunde os efeitos das variáveis principais com a interação entre quatro variáveis, e a interação entre duas variáveis é confundida com a interação entre três variáveis.

A realização de um planejamento fatorial fracionário faz com que se pague esse preço. Porém, como dificilmente a interação entre três ou mais variáveis gera um efeito significativo na resposta, ele serve como um excelente ponto de partida para a otimização experimental. As variáveis ou interações entre variáveis, tidas como significativa, podem ser ainda melhor otimizadas com o uso da técnica de superfície de resposta.

2 OBJETIVOS

- ✓ Avaliar cartuchos de sorção disponíveis comercialmente para MEPS, que possam ser utilizados para determinação de ametrina, atrazina, bifentrina, carbofurano, metribuzim e tebutiuram em amostras de garapa.
- ✓ Avaliar o uso do grafeno sintetizado a partir do grafite como material sorvente em MEPS, assim como seu emprego na determinação dos mesmos agrotóxicos.
- ✓ Otimizar, com aplicação de planejamento experimental, as variáveis que afetam o desempenho da extração por MEPS na análise de agrotóxicos em garapa.
- ✓ Validar o método desenvolvido avaliando a seletividade (interferentes); efeito matriz; linearidade; recuperação/veracidade (exatidão); precisão (repetitividade); limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) ; e robustez.
- ✓ Comparar os resultados obtidos com os dispostos na literatura e que utilizam diferentes microtécnicas de extração, por exemplo, SPME e SBSE.
- ✓ Aplicar o método desenvolvido e validado na análise de amostras reais disponíveis comercialmente.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e padrões

Utilizaram-se padrões de agrotóxicos da Riedel-de Haën (tebutiurum, bifentrina e ametrina) e Fluka (carbofurano, atrazina e metribuzim). A Figura 5 mostra a estrutura desses compostos. Os solventes, acetato de etila, hexano, metanol e acetonitrila foram adquiridos da Tedia. Para síntese do grafeno foram adquiridos grafite, p-fenileno diamina (PFD), NaNO_3 , KMnO_4 e N,N di-metilformamina (DMF) da Sigma-Aldrich, H_2SO_4 da Tedia, H_2O_2 da Synth e HCl da Chemis. Na avaliação da influência do pH no processo de extração foram utilizados ácido fórmico 96% da Tédia e hidróxido de amônio da Chemis.

Figura 5 – Estrutura dos agrotóxicos utilizados no desenvolvimento do método.

3.2 Materiais

- ✓ Seringa MEPS de 250 μ L com agulha removível marca SGE;
- ✓ Agulhas com BIN (barrel insert and needle) preenchidos com C18, C8, SCX, SAX e SIL , também da SGE;
- ✓ Dispositivos para MEPS *home-made* acoplado a uma seringa Hamilton de 250 μ L;⁵⁰
- ✓ Fase extratora C18 (Chromabond) e HLB (Oasis);
- ✓ Balões volumétricos de 5 e 10 mL marca Pyrex;
- ✓ Vials de 2 mL e inserts;
- ✓ Tubos Eppendorf de 0,5 e 2 mL;
- ✓ Tubos Falcom de 15 e 50 mL;

3.3 Equipamentos

- ✓ GC-MS QP5050 da Shimadzu;
- ✓ Micro-Raman Renishaw RM2000;
- ✓ Difratorômetro de raios-x (XRD) Rigaku Ultima IV;
- ✓ pHmetro micronal B 374;
- ✓ Balança analítica Mettler AG285;
- ✓ Centrifuga Hettich AG285, Mettler Toledo;
- ✓ Centrifuga MiniSpin plus (Eppendorff);
- ✓ Lavadora ultra-sônica ultra clear, Unique;

3.4 Métodos

3.4.1 Preparo das soluções estoque de padrões

Foram preparadas soluções estoques dos padrões de agrotóxicos em acetonitrila na concentração de 100 mg L^{-1} , as quais foram armazenadas a -4°C . As soluções estoques foram utilizadas no preparo das soluções de trabalho utilizadas na fortificação da garapa, também utilizando acetonitrila para diluição.

3.4.2 Preparo das amostras de garapa

As amostras de garapa foram adquiridas no comércio da cidade de São Carlos e passaram por um pré-tratamento onde foram centrifugas a 10000 rpm por 10 minutos. Após essa centrifugação, efetuou-se uma filtração a vácuo, para que possíveis sólidos ainda contidos na amostra fossem removidos evitando o entupimento dos cartuchos de MEPS. As amostras foram armazenadas a -20°C , e fechadas, para sua posterior utilização. Antes de seu uso as amostras foram expostas à temperatura ambiente para serem descongeladas e fortificadas com os agrotóxicos antes de sua utilização.

3.4.3 Condições cromatográficas

Utilizou-se hélio como gás de arraste com a seguinte programação de temperatura: A corrida inicia com 120°C , temperatura que é mantida por 2 minutos, e aumentada a uma taxa de aquecimento de $30^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até atingir 210°C . Posteriormente a taxa de aquecimento é aumentada para $55^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até chegar a 280°C , onde a temperatura é mantida por 6 min. A coluna utilizada foi uma RTX-5MS (5% difenil / 95% dimetil polisiloxano, 30m x 0,25mm x 0.25 μm) da Restek

(Bellefonte,USA). As condições do equipamento foram: modo splitless, temperatura de injeção 265°C; temperatura da interface 300°C; sampling time 1 minuto; column inlet pressure 113,2 KPa, column flow 1,4 mL . min⁻¹, linear velocity 44 cm. sec⁻¹, total flow 18,9 mL. min⁻¹. Injetou-se 1µL do solvente extração no sistema, após a extração por MEPS.

3.4.4 Síntese do grafeno

O método escolhido para a obtenção do óxido de grafite foi o de Hummers,⁴⁵ pois já foi empregado como forma de se obter o óxido de grafite para sua posterior redução a grafeno, para uso em microtécnicas de extração como a SBSE⁴² e SPME.³⁷ Na etapa de redução do óxido de grafeno a grafeno se utilizou a PFD como agente redutor.⁵¹ O procedimento utilizado para essa síntese é descrito a seguir.

Em um balão de fundo redondo foram colocado 0,5 g de grafite em pó, 0,5 g de NaNO₃ e 23 mL de H₂SO₄ (96%), os quais foram agitados em um banho de gelo por 1h. Em seguida se adicionou lentamente 3,0 g de KMnO₄, removeu-se o banho de gelo e se agitou a mistura em temperatura ambiente 2 h. A seguir 46 mL, de água foram adicionados lentamente usando um conta gotas e, então, a solução foi aquecida em um banho de óleo a 98 °C por 30 minutos, com adição posterior de mais 100 mL de água e 10 mL de H₂O₂ 30%. A mistura foi centrifugada a 4000 rpm e lavada seis vezes com HCl aquoso 10% (v/v) para remover íons metálicos da solução. Posteriormente, o sedimento é lavado com água deionizada para remover o ácido e centrifugado a 8000 rpm. O sedimento final é, então, secado a 40°C por 72 h e redisperso em água por 1 hora em ultrassom para se preparar uma solução de 1 mg.mL⁻¹ de óxido de grafeno.

Para redução do óxido de grafeno a grafeno, 1,2g de PFD é dissolvidos em 100 mL de DMF e se adiciona 100 mL da solução de óxido de grafeno . A mistura é colocada em um banho de óleo à aproximadamente 98°C em refluxo por 36 horas. A solução é, então, filtrada e lavada com acetona, para remoção de toda a PFD.

3.4.5 Caracterização do grafeno

A caracterização do grafeno pode ser feita com auxílio de diversas técnicas de análise elementar como: Difração de Raios-X (XRD),^{38; 52} Raman,^{38; 52; 53} Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios-X (XPS),⁵³ Adsorção de Gás,⁵³ Análise Termogravimétrica (TGA) e⁵³ Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C (RMN).⁵³

Dentre essas técnicas, as escolhidas para caracterizar o grafeno sintetizado foram a Difração de Raios-X e o Raman, pois fornecem informações suficientes para analisar o sucesso da síntese. Luo et al.³⁸ já caracterizam fibras de grafeno dessa forma.

Na aquisição dos espectros de XRD utilizou-se radiação Cu K α (40kV/30mA), modo de varredura contínua, velocidade de varredura (1,000°/min) e amplitude de varredura de 5° a 90°.

A obtenção de espectros Raman de materiais derivados do grafite exige o uso de lasers apropriados capazes de emitir radiação na faixa de 488 nm.⁴⁷ Os espectros do grafite, óxido de grafeno e grafeno sintetizado, foram obtidos no laboratório de Filmes Finos do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP), por cortesia do professor Antonio Ricardo Zanatta. As condições utilizadas do equipamento foram: Laser 488.0 nm (potência ~ 100microWatt), geometria de backscattering e lente objetiva de 50x (spot size ~ 1micron).

3.4.6 Planejamento experimental fatorial fracionário 2⁴⁻¹

Como as variáveis que podem afetar o desempenho do MEPS são muitas, e também, se desejava verificar o desempenho dos cartuchos de sorção preenchidos com diferentes materiais sorventes, optou-se por verificar, para cada fase testada, em um primeiro momento as variáveis: pH, força iônica (% NaCl (m/v)), solvente de eluição, volume do solvente de eluição (μ L). Os níveis testados dessas variáveis são descritos na Tabela 4 e a matriz do planejamento realizado é idêntico ao da Tabela 3, com os experimentos realizados em ordem aleatória.

Tabela 4 - Níveis das variáveis avaliadas no experimento fatorial 2^{4-1} .

Variável	-1	1
(1) pH	3	10
(2) Força iônica % NaCl (m/v)	0%	20%
(3) Solvente de eluição	Hexano	Acetato de Etila
(4) Volume do solvente de eluição (μL)	50	150

Nessa otimização foi verificado, por um experimento fatorial fracionário 2^{4-1} , quais das variáveis descritas na Tabela 4 afetariam o processo de extração, significativamente, para que a decisão da escolha da fase fosse feita levando em consideração o seu melhor desempenho. As variáveis ciclos de aspiração da amostra, lavagem e desorção (eluição) foram otimizadas em uma etapa posterior, pois em alguns trabalhos descritos na literatura utilizando MEPS, essas variáveis normalmente influenciaram o processo.^{29, 33} Por isso, nessa otimização, foram realizados 6 ciclos de aspiração de amostra, 8 ciclos de desorção e para a etapa de lavagem foram realizados 4 ciclos com 100 μL de água ultrapura. Na etapa de condicionamento se utilizou 1 mL do solvente de eluição (4x 250 μL) seguido por 750 μL de H₂O (3 x 250 μL), e na de secagem do sorvente 5x 250 μL de ar.

As fases avaliadas nessa otimização foram C18 da Chromabond, HLB Oasis da Waters e C8, C18, SCX, SAX e SIL, empregando seringas de MEPS com dispositivo home-made e da SGE Analytical Science respectivamente.

O pH pode influenciar diretamente na eficiência da extração, possibilitando ou não a ionização dos analitos. Essa influência depende do pKa dos analitos, sendo os empregados nesse estudo, apresentados na Tabela 5. Essa influência poderia ser notada principalmente para a ametrina que possui pKa igual à 4,1. Para alterar o pH da garapa, foram utilizados ácido fórmico e hidróxido de amônio.

A adição de sais inorgânicos em uma solução, como o NaCl, pode levar a diminuição da solubilidade do soluto (*efeito "salting out"*), facilitando, assim, que os analitos migrem para a fase estacionária presente no cartucho do MEPS.

O solvente de eluição afeta a remoção dos analitos na fase extratora, pois analitos mais apolares como a bifentrina são removidos mais facilmente por solventes mais apolares, enquanto analitos mais polares são removidos por solventes mais polares. Os valores de Log K_{ow} também são apresentados na Tabela 5.

O volume do solvente de eluição afeta diretamente no fator de concentração da amostra. Por exemplo, utilizando uma seringa de 250 μL e volume do solvente de desorção da ordem de 50 μL , é possível obter um fator de concentração de 5x.

A análise dos resultados foi feita com auxílio do software Statistica 7.0. Por análise de variância (ANOVA), foram construídos gráficos de pareto das variáveis estudadas para cada agrotóxico utilizando os diferentes sorventes. Os parâmetros escolhidos foram utilizados na comparação univariada das fases extradoras para escolha do melhor material sorvente.

Tabela 5 - Valores de pKa e do logaritmo do coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow}$) dos agrotóxicos estudados.

Agrotóxico	pKa	Log K_{ow}
Tebutiurum	-	1,79
Carbofurano	-	1,8
Atrazina	1,7	2,7
Metribuzim	1,0	1,65
Ametrina	4,1	2,63
Bifentrina	-	6,6

Fonte: TOMLIN, C. The Pesticide manual : a world compendium : incorporating the agrochemicals handbook. ⁵⁴

3.4.7 Otimização univariada do volume de eluição

Para melhorar o fator de concentração (volume da amostra/volume do solvente de eluição) foram testados outros volumes de solvente de eluição (30, 40 e 50 μL). Os testes foram realizados em duplicata para cada volume de eluição nas condições definidas através do item 3.4.6. As amostras foram previamente fortificadas com 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dos agrotóxicos em estudo.

3.4.8 Otimização da extração do MEPS por planejamento fatorial 2^3

Por intermédio de um planejamento fatorial completo 2^3 , com ponto central em triplicata, e de amostra previamente fortificada com $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ dos agrotóxicos em estudo, foi realizada a otimização das etapas de: ciclos de aspiração da amostra, lavagem e eluição. Também, foi verificado se havia interação significativa, entre essas variáveis para o processo de extração. As variáveis condicionamento/regeneração e ciclos de secagem foram idênticos às descritas no item 3.4.6. Os níveis testados são mostrados na Tabela 6. A matriz do planejamento é semelhante à da Tabela 3 sem a última coluna ($4=123$) e com a inclusão de mais três experimentos referentes as triplicatas do ponto central.

Tabela 6- Níveis das variáveis avaliados na otimização da extração por MEPS.

Variável	Níveis		
	-1	0	1
(1) Ciclos de aspiração da amostra	3	6	9
(2) Ciclos de eluição	8	10	12
(3) Ciclos de lavagem	2	4	6

3.4.9 Validação

A validação do método foi realizada baseando-se no Manual de Garantia da Qualidade Analítica, do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA).⁵⁵ Os parâmetros avaliados, seguindo os procedimentos utilizados na determinação de agrotóxicos em matrizes de origem vegetal e animal, foram: seletividade (interferentes); efeito matriz; linearidade; recuperação/veracidade (exatidão); precisão (repetitividade); limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ); e robustez.

3.4.9.1 Seletividade (interferentes)

Para avaliação de seletividade, foram analisadas seis amostras não fortificadas (brancos) e verificadas as possíveis interferências, ou seja, sinais e picos no tempo de retenção em que se espera a eluição dos analitos.

3.4.9.2 Efeito Matriz

O procedimento para verificação do efeito de matriz não necessita ser realizado no caso de se utilizar uma curva de calibração com matriz branca fortificada.⁵⁵ Porém, a fim de se estimar esse efeito, realizou-se uma comparação entre as áreas obtida da matriz e de água ultra-pura (Milli-Q) nas seguintes concentrações: tebutiuram (250 µg/L), carbofurano (50 µg/L), atrazina (50 µg/L), metribuzim (75 µg/L), ametrina (50 µg/L) e bifentrina (50 µg/L).

É possível encontrar esse mesmo tratamento em outros trabalhos para determinação de agrotóxicos por MEPS.^{33, 34, 35}

3.4.9.3 Linearidade

A linearidade foi verificada analisando-se amostras de garapa (brancos) fortificadas após passarem pelo processo de extração por MEPS, e posterior análise por GC-MS. Realizou-se a fortificação em seis níveis de concentração (Tabela 7) para cada composto de interesse, com cinco réplicas de cada nível. Na construção das curvas de calibração foram levados em consideração os valores de LMR determinados pela ANVISA para a cultura de cana-de-açúcar,¹⁴ visto que não há legislação específica sobre os LMR desses agrotóxicos em garapa.

As curvas de calibração para cada composto foram obtidas por padronização externa. Os dados foram avaliados em relação à sua dispersão. Foi verificado se os

Tabela 7 - Valores de concentração utilizados na avaliação da linearidade.

Composto	Concentração (ug.L ⁻¹)					
Tebutiuram	10	30	150	400	725	1000
Carbofurano	2	6	30	80	145	200
Atrazina	2	6	30	80	145	200
Metribuzim	3	9	45	120	217,5	300
Ametrina	2	6	30	80	145	200
Bifentrina	2	6	30	80	145	200

dados possuíam a mesma variância em todos os pontos da curva (homocedásticos); em caso de variâncias diferentes, são considerados heterocedásticos.

Para auxiliar na avaliação da homo ou heterocedasticidade, foi aplicado o teste F, que compara a variância do maior ponto da curva com o menor (F_{exp}), e depois compara-se com o F tabelado (F_t); caso não haja homocedasticidade o F_{exp} será maior que o F_t .

Após o teste F, como o modelo linear sem ponderação não apresentou homocedasticidade, foi testada a aplicação de diversos pesos (w) à equação linear, sugeridos por Almeida et al.⁵⁶, que podem permitir uma melhor exatidão nas concentrações mais baixas. Os pesos (w) testados foram: x^{-2} , x^{-1} , $x^{-0,5}$, y^{-1} , y^{-2} e $y^{0,5}$.

No teste do modelo linear sem ponderação ($w=1$), utilizou-se o método dos mínimos quadrados. A Equação 2 representa a equação linear aplicável aos dados analíticos, e nas Equações 3 e 4 são utilizadas nos cálculos dos coeficientes angular (b) e linear (a), respectivamente.

$$y = bx + a \quad (\text{Eq. 2})$$

$$b = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \cdot \sum y_i}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$a = \frac{\sum x_i^2 \cdot \sum y_i - \sum x_i \cdot \sum x_i y_i}{n \cdot \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \quad (\text{Eq. 4})$$

Após a avaliação do modelo linear, ajustou-se a Equação 2 aos dados ponderados. Na avaliação dos modelos lineares ponderados, os coeficientes angulares (b) e lineares (a) são definidos pelas Equações 5 e 6, respectivamente.

$$b = \frac{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i y_i}{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \quad (\text{Eq. 5})$$

$$a = \frac{\sum w_i x_i^2 \cdot \sum w_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i x_i y_i}{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \quad (\text{Eq. 6})$$

O coeficiente de correlação da reta ponderada é dada pela Equação 7.

$$r = \frac{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i y_i}{\sqrt{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \cdot \sqrt{\sum w_i \cdot \sum w_i y_i^2 - (\sum w_i y_i)^2}} \quad (\text{Eq. 7})$$

A partir da avaliação das equações possíveis (ponderadas ou não) foi escolhido o modelo que apresentou a menor soma de resíduos percentuais, em módulo, e que possibilitou um aumento no coeficiente de determinação (R^2).⁵⁶

3.4.9.4 Recuperação/Veracidade (exatidão) e eficiência do processo de extração

A veracidade, segundo o vocabulário internacional de metrologia, é definida como: “grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência”.⁵⁵

A determinação da veracidade é realizada por ensaios de recuperação, utilizando, preferencialmente, material de referência certificado (MRC). Como no

presente estudos não havia MRC disponível, a determinação da recuperação foi realizada por intermédio de matriz branca fortificada. Nesse caso, através da Equação 8 é obtido o fator de recuperação (f_{rec}).

$$f_{rec}(\%) = \frac{C_f - C_{nf}}{C_{ad}} \times 100 \quad (\text{Eq. 8})$$

C_f = teor medido após fortificação da matriz branca;

C_{nf} = teor medido na matriz branca não fortificada;

C_{ad} = teor do analito puro adicionado à matriz branca;

Para esse estudo foram realizadas fortificações em três níveis de concentração, (Tabela 8), e em cada nível o experimento foi realizado em quintuplicata.

Também foi realizada uma estimativa da eficiência do processo de extração dividindo o coeficiente angular (b) de uma curva construída em solvente (acetato de etila) pelo coeficiente angular da curva obtida através da matriz fortificada.

Tabela 8 - Níveis de concentração utilizados na avaliação da recuperação.

Composto	Nível de concentração (ug/L)		
	1	2	3
Tebutiurum	15	250	750
Carbofurano	3	50	150
Atrazina	3	50	150
Metribuzim	4,5	75	225
Ametrina	3	50	150
Bifentrina	3	50	150

3.4.9.5 Precisão (repetitividade)

A precisão (repetitividade) intra-dia foi avaliada em quintuplicata utilizando os mesmos níveis descritos na Tabela 8 em dois dias consecutivos, utilizando os resultados obtidos na avaliação da veracidade/recuperação (exatidão). A precisão foi avaliada na forma do coeficiente de variação (CV), avaliando-se os dias 1 e 2, e também, o CV inter-dias.

3.4.9.5 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

O limite de detecção (LOD) do método foi definido como a concentração do analito que produz um sinal de três vezes a razão sinal/ruído do equipamento. O limite de quantificação (LOQ) foi estabelecido como a menor concentração do analito que fornece uma relação sinal/ruído de no mínimo dez vezes, e que apresente um $CV \leq 20\%$, atendendo os critérios de veracidade 70 a 120%.

3.4.9.6 Robustez

Para a análise de robustez do método, foram utilizados os resultados obtidos por intermédio dos experimentos fatoriais (fracionários ou completos) realizados durante a etapa de otimização do método.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Separação cromatográfica

As condições cromatográficas utilizadas foram as descritas no item 3.4.3; os íons monitorados no sistema GC-MS, juntamente com a faixa de tempo de monitoramento para cada agrotóxico, estão descritos na Tabela 9. O cromatograma do íon extraído da injeção de 1 µL da solução padrão dos analitos na concentração de 0,5 mg L⁻¹ está ilustrado na Figura 6. Nela é possível notar que uma parte do pico da atrazina sofre coeluição com o carbofurano, porém isso não impede a quantificação dos compostos, uma vez que a detecção é realizada por espectrometria de massas (modo SIM).

Tabela 9 - Íons monitorados após a separação cromatográfica dos analitos de interesse e seus respectivos tempos de monitoramento.

Agrotóxico	Íons monitorados	Tempo de monitoramento (min)
Tebutiuram	156 , 171, 157	2 – 5,58
Carbofurano	164 , 149, 131	5,6 - 6,48
Atrazina	200 , 215, 173	5,6 – 6,48
Metribuzim	198 , 144, 103	6,5 – 7,48
Ametrina	227 , 212, 170	6,5 – 7,48
Bifentrina	181 , 166, 165	7,5 – 9,9

*Em destaque os íon utilizados na quantificação

Figura 6 - Cromatograma de massas (GC-MS) obtido da injeção de 1 µL dos padrões dos analitos de interesse na concentração de 0,5 mg/L .

4.2 Caracterização do Grafeno

4.2.1 Difração de Raio-X

Os difratogramas obtidos nesse trabalho para o grafite, óxido de grafeno e grafeno são ilustrados na Figura 7. Para o grafite o pico em $26,5^\circ$ correspondente a difração (002)^{38; 52}; as difrações (100) e (101) se unem para dar um pico largo, próximo a 45° .⁵² No difratograma do óxido de grafeno a ausência do pico em $26,5^\circ$, e a presença do pico próximo a 10° indica que a oxidação do grafite a óxido de grafeno foi bem sucedida. A posterior redução do óxido de grafeno a grafeno, restaura a estrutura cristalina ordenada do composto. Isto pode ser notado pelo desaparecimento do pico próximo a 10° (óxido de grafeno) e reaparecimento do pico próximo a 25° (pico de difração (002)) indicando que a síntese foi bem sucedida.

Figura 7 - Difratogramas do grafite, óxido de grafite e grafeno.

4.2.2 Espectroscopia Raman

A Figura 8 mostra a sobreposição dos espectros Raman obtidos nesse trabalho para o grafite, óxido de grafeno e grafeno. Todos os materiais apresentam a ocorrência de uma banda em cerca de ($\sim 1600\text{ cm}^{-1}$) e outra em ($\sim 1300\text{ cm}^{-1}$) que correspondem, respectivamente, as bandas G e D.

Comparado com o grafite, o óxido de grafeno e grafeno, apresentam uma banda D e G mais alargada, sendo que a banda D se torna mais intensa para esses dois materiais. O maior alargamento na banda G do grafeno pode ser devido a resquícios de PFD, que não tenham sido completamente removidos após a síntese do material.

A razão entre a intensidade da banda D pela G (I_D/I_G) é usada para comparar o grau de desordem do material.⁵² Essa razão é aproximadamente 0,93 e 0,82, para o grafeno e óxido de grafeno, respectivamente, indicando que a desordem das folhas de grafeno aumenta durante a redução do óxido de grafeno à grafeno.

Figura 8 - Espectro Raman com laser de emissão em 488nm do grafite, óxido de grafeno e grafeno.

4.3 Planejamento Experimental Fatorial Fracionário 2^{4-1}

No planejamento experimental fatorial fracionário 2^{4-1} foram avaliadas as variáveis pH, força iônica, solvente de eluição e volume do solvente de eluição. Levando em conta a área do pico do íon extraído obtido, as razões da escolha dessas variáveis foram descritas no item 3.4.6, assim como os níveis testados encontram-se citados na Tabela 4. As fases avaliadas nesse planejamento foram: C18 (Chromabond), HLB Oasis (Waters) e C18, C8, SCX, SAX, SIL (SGE Analytical Science). Nas Figura 9 a 15 são apresentados os diagramas de pareto dos efeitos dessas variáveis, levando em consideração cada agrotóxico. Os efeitos significativos foram resumidos na Tabela 10, para facilitar o entendimento.

Figura 9 - Fatorial Fracionário 2^{4-1} utilizando C18 (Cromabond) como fase extratora, e agrotóxicos na concentração de $0,4 \text{ mg L}^{-1}$.

Figura 10 - Fatorial Fracionário 2^{4-1} utilizando HLB Oasis da Waters como fase extratora, e agrotóxicos na concentração de $0,4 \text{ mg L}^{-1}$.

Figura 11 - Fatorial Fracionário 2^{4-1} utilizando C18 da SGE Analytical Science como fase extratora, e agrotóxicos na concentração de $0,4 \text{ mg L}^{-1}$.

Figura 12 - Fatorial Fracionário 2^{4-1} utilizando C8 da SGE Analytical Science como fase extratora, e agrotóxicos na concentração de $0,4 \text{ mg L}^{-1}$.

Figura 13 - Fatorial Fracionário 2^{4-1} utilizando SCX da SGE Analytical Science como fase extratora, e agrotóxicos na concentração de $0,4 \text{ mg L}^{-1}$.

Figura 14 - Fatorial Fracionário 2^{4-1} utilizando SAX da SGE Analytical Science como fase extratora, e agrotóxicos na concentração de $0,4 \text{ mg L}^{-1}$.

Figura 15 - Fatorial Fracionário 2^{4-1} utilizando SIL da SGE Analytical Science como fase extratora, e agrotóxicos na concentração de $0,4 \text{ mg L}^{-1}$.

A partir da análise desses experimentos fatoriais fracionários 2^{4-1} (Tabela 10), foram selecionadas as melhores condições para realização de uma comparação univariada para que a melhor fase extratora fosse selecionada.

O pH (1) só foi significativo para a atrazina utilizando SIL como fase extratora; para as outras fases não afetou significativamente a área dos picos (variável

resposta). Assim, o pH escolhido para a próxima etapa de comparação foi o da própria amostra de garapa (em torno de 4 - 4,6) visto que esta variável não afetou significativamente o processo de extração para quase todas as fases extratoras, com exceção da atrazina quando a fase era SIL, em que um aumento de pH causou uma diminuição significativa na área do pico.

A variável força iônica (2) não foi significativa para nenhuma fase extratora e, por isso, o nível escolhido para todas foi o que não tinha adição de NaCl (força iônica 0% (m/v) de NaCl).

O solvente de extração (3) que apresentou melhores resultados, aumentando significativamente o sinal do pico na maioria dos casos, foi o acetato de etila. O acetato de etila também foi utilizado como solvente de extração em outros estudos como, por exemplo, o de Barletta et al.⁸, para determinação de agrotóxicos em garapa por SBSE, e por Lanchote et al.⁵⁷ na análise de resíduos de triazinas utilizadas no cultivo de cana-de-açúcar, na matriz de água potável. A única exceção foi o resultado obtido para o tebutiurum quando a fase usada era SIL, em que houve uma diminuição na área obtida do pico. A fase SIL é mais polar entre as utilizadas e, talvez por isso, o tebutiurum possa ter ficado mais retido não sendo o acetato de etila adequado para sua remoção nessa situação.

Tabela 10 - Variáveis com efeitos significativos no experimento fatorial fracionário 2^{4-1} , levando em consideração a fase extratora utilizada e o agrotóxico. A numeração das variáveis segue a relação: (1) pH, (2) força iônica % (m/v), (3) solvente de eluição e (4) volume do solvente de eluição.

Fase	Agrotóxico					
	Tebutiurum	Carbofurano	Atrazina	Metribuzim	Ametrina	Bifentrina
C18 (Chromabond)	----	----	----	----	(+)3	(-)4
HLB Oasis	----	----	(+)3	----	----	----
C18	(+)3	----	----	----	(+)3	----
C8	(+)3	(+)3	(+)3	(+)3	(+)3	----
SCX	----	----	----	----	----	----
SAX	(-)4	----	----	----	(-)4	----
SIL	(-)3	----	(-)4;(-)1	----	----	----

---- nenhuma variável apresentou efeito significativo na área do pico.

(+) representa aumento significativo na área do pico.

(-) representa diminuição significativa na área do pico.

O volume do solvente (4) utilizado na eluição apresentou, em alguns casos, diminuição significativa na área do pico quando o volume utilizado na extração passou de um nível baixo (50 μL) para um nível alto (150 μL). Isso ocorre devido a uma diminuição no fator de concentração da extração. Como o volume de amostra aspirado foi sempre de 250 μL , e os volumes do solvente de eluição avaliados foram de 50 μL ou 150 μL , os fatores de concentração nesse caso são 5 e 1,6 vezes, respectivamente. Assim, o volume de solvente escolhido para se realizar as extrações foi de 50 μL . Após a comparação e escolha da melhor fase extratora, foi realizado um experimento univariado com o intuito de aumentar o fator de concentração.

4.4 Comparação entre as fases extradoras

Com as condições experimentais obtidas dos experimentos fatoriais 2^{4-1} , foram realizadas extrações em triplicata para cada fase, com o intuito de verificar a melhor fase para os agrotóxicos estudados na matriz garapa. Os resultados são apresentados na Figura 16.

As condições utilizadas para as fases C18 (Chromabond), HLB Oasis (Waters) C18, C8, SCX e SAX (SGE Analytical Science) foram as derivadas dos experimentos fatoriais fracionários 2^{4-1} (item 4.3). As etapas de condicionamento/regeneração, lavagem, secagem da fase extratora e eluição utilizadas estão resumidas abaixo, sendo elas idênticas ao item 3.4.6.

- Condicionamento/Regeneração: 1mL de Acetato de Etila (4x250 μL) + 750 μL H_2O (3x250 μL).
- Ciclos de aspiração da amostra (Amostragem): 6x 250 μL de garapa fortificada.
- Ciclos de lavagem: 4x 100 μL H_2O ultrapura.
- Ciclos de secagem do material sorvente: 5x
- Ciclos de eluição: 8x 50 μL de acetato de etila.

Figura 16 - Comparação entre as fases extratoras, utilizando as mesmas condições de extração em uma amostras de garapa fortificada com $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ dos agrotóxicos em estudo.

A única exceção foi a SIL (SGE Analytical Science), que utilizou na etapa de eluição o hexano como solvente; todas as outras condições foram iguais às citadas acima, com exceção ao condicionamento que, nesse caso, foi realizado com hexano.

Na Figura 16 é possível notar que a fase C18 (Chromabond) apresentou o melhor resultado para o agrotóxico bifentrina. Porém, para os outros compostos em estudo essa diferença não foi tão acentuada, tendo a C18 (Chromabond) um desempenho relativamente melhor que as outras para os agrotóxicos carbofurano e metribuzim.

4.5 Avaliação do grafeno como sorvente em MEPS

A avaliação do grafeno como material sorvente apresentou dificuldades na etapa de aspiração das amostras de garapa, provavelmente devido a sua elevada

área superficial ($2630 \text{ m}^2/\text{g}$)⁴³ e, também, a grande quantidade de açúcares presentes nesse tipo de amostra. Dessa forma, foi inviável, até o presente a avaliação de um cartucho de sorção preenchido só com grafeno.

Na tentativa de contornar essa dificuldade foi feita uma mistura de grafeno com a fase C18 (Chromabond) na proporção de 10% e 90%, respectivamente. Nessas condições, a etapa de aspiração da amostra também não foi bem sucedida; após a realização de um ciclo completo de aspiração da amostra, o cartucho apresentava entupimento no próximo ciclo.

Com objetivo de realizar uma avaliação inicial do grafeno como material sorvente em MEPS, foram preparadas soluções de H_2O destilada fortificada com os mesmos agrotóxicos em estudo na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ e feito uma comparação entre a fase C18 (Chromabond) pura e uma mistura contendo 10% de grafeno. Os resultados são apresentados na Figura 17. As condições utilizadas foram as mesmas daquelas empregadas na comparação do item 4.4, porém, foram realizados experimentos com 3 e 6 ciclos de aspiração da amostra, todos em triplicata.

Os resultados estão apresentados na Figura 17; nela é verificado que quando são realizados 3 ciclos de aspiração da amostra de água destilada fortificada com os agrotóxicos em estudo na garapa, a mistura de fases com 10% de grafeno apresentou os melhores resultados, principalmente para a bifentrina. Esse fato pode ser explicado pelo sistema de elétrons- π deslocalizados do grafeno que permite uma forte interação com estruturas que possuem anéis benzênicos.⁴³ Essa melhora de extração, também foi verificada para o carbofurano e atrazina; contudo, a melhora foi mais acentuada para a bifentrina que possui dois anéis benzênicos. Quando o número de ciclos de aspiração da amostra aumentou para 6, tanto a C18 (Chromabond) como a mistura com grafeno apresentaram resultados próximos.

Uma possível alternativa para contornar os problemas de entupimento, e tornar possível o uso do grafeno em MEPS, seria uso de grafeno ou óxido de grafeno ligado covalentemente à sílica. Já existem, na literatura, trabalhos que utilizam essa abordagem.^{58, 59, 60} O material é produzido ligando óxido de grafeno em grupos amino-terminais de uma amino-sílica e, posteriormente, pode-se realizar a redução do óxido de grafeno a grafeno. A Figura 18 ilustra o procedimento sugerido por Liu et al.⁶⁰ que também comparam a síntese realizada em meio aquoso e orgânico, sendo a última a que demonstrou melhor performance.

Figura 17 - Comparação entre C18 (Chromabond) e uma mistura de fases na composição de 10% de grafeno (G) e 90% C18 (Chromabond), variando os ciclos de aspiração da amostra em 3 e 6 vezes, simbolizados por (3x) e (6x) respectivamente. Extração de água destilada fortificadas com os agrotóxicos em estudo na concentração $0,2 \text{ mg L}^{-1}$.

Figura 18 - A) Modelo de nanofolhas de óxido de grafeno (GO) e grafeno (G). A parte sombreada indica a presença de grupos polares. B) Rota sintética para síntese de GO@silica e G@silica. NP-SPE = SPE em fase normal, RP-SPE = SPE em fase reversa.

FONTE: LIU et al. Graphene and Graphene Oxide Sheets Supported on Silica as Versatile and High-Performance Adsorbents for Solid-Phase Extraction. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 26, p. 5913-5917, 2011. ⁶⁰

4.6 Otimização do volume de eluição do método

Para melhorar o fator de concentração do método, a fim de se chegar em menores limites de quantificação, realizou-se uma avaliação univariada de diferentes volumes de eluição da amostra. Através disso foi possível concluir que o melhor volume a ser utilizado é 30 μ L, como é possível observar na Figura 19. Esse volume faz com que, em caso de 100% de eficiência de extração, a concentração da amostra aumente 8,3 vezes (250 μ L de amostra/30 μ L de solvente).

Figura 19 - Comparação entre a área obtida para cada agrotóxico utilizando diferentes volumes do solvente de eluição para a fase C18 Chromabond.

4.7 Otimização da extração do MEPS por planejamento experimental fatorial 2³

A otimização realizada do MEPS, mostrou que, dentro dos níveis testados para cada variável, as que afetaram significativamente o processo de extração foram os ciclos de aspiração da amostra e os de lavagem. O aumento nesses ciclos levou

a uma melhora no processo de extração para o tebutiurum, carbofurano, atrazina e metribuzim. No caso da ametrina, somente o aumento nos ciclos de aspiração da amostra apresentou melhora significativa no processo de extração. No caso da bifentrina, nenhuma variável foi significativa. Esses resultados são apresentados nos diagramas de pareto da Figura 20.

Figura 20 - Diagrama de pareto fatorial completo 2^3 com ponto central, otimização dos ciclos de: aspiração da amostra, lavagem e eluição.

O aumento dos ciclos de aspiração da amostra proporciona uma maior interação dos analitos com a fase estacionária, melhorando a eficiência do processo de extração. Já o aumento dos ciclos de lavagem melhora a remoção dos interferentes que podem atrapalhar na ionização dos analitos.

Essa é uma hipótese válida para o caso do presente estudo pois, dependendo do desenvolvimento analítico, um aumento nos ciclos de aspiração e lavagem podem, respectivamente, aumentar a quantidade de interferentes retidos na fase estacionária e/ou fazer com que os analitos sejam removidos durante essa etapa.

A Figura 21 ilustra as superfícies de resposta obtidas por esse planejamento experimental, para cada agrotóxico. Nela é possível visualizar que o aumento nos ciclos de aspiração e lavagem fazem com que as áreas dos picos dos agrotóxicos em estudo aumentem.

Por esses resultados, foram definidos os parâmetros que seriam utilizados na validação do método. A Tabela 11 mostra os parâmetros da extração por MEPS que foram utilizados na validação do método.

O parâmetro condicionamento/regeneração, foi definido levando em conta o número de ciclos que seria suficiente para que não ocorresse efeito de memória. Esse fator também contribui para o aumento da vida útil do cartucho de sorção.³¹ Os ciclos de secagem usados foram suficientes para que toda água retida no material sorvente depois da etapa de lavagem fosse removida.

Figura 21 - Superfícies de respostas obtidas, através do planejamento experimental 2^3 .

Tabela 11 - Parâmetros da extração por MEPS utilizados na etapa de validação.

Etapa	Parâmetros
Condicionamento/Regeneração*	1mL (4x 250 µL) de acetato de etila; 750 µL (3x 250 µL) de H ₂ O (Milli-Q)
Ciclos de aspiração da amostra	9x 250 µL de garapa
Ciclos de lavagem	6x 100 µL de H ₂ O (Milli-Q)
Ciclos de secagem*	5x 250 µL de ar
Ciclos de eluição	8x 30 µL de acetato de etila

*Parâmetros que não foram otimizados.

4.8 Validação

4.8.1 Seletividade (interferentes)

O método mostrou-se seletivo, pois não foi verificada coeluição de interferentes, no mesmo tempo de retenção dos analitos, quando as amostras de garapa livres de fortificação (brancas) foram analisadas. Os cromatogramas representativos dos agrotóxicos em estudo, das amostras de garapa branca, e da garapa fortificada na concentração do LOQ do método, são ilustrados na Figura 22.

Figura 22 - Cromatogramas representativos dos agrotóxicos em estudo da garapa sem fortificação (branco) e fortificada na concentração do LOQ.

4.8.2 Efeito Matriz

Os resultados da estimativa do efeito de matriz são expostos na Tabela 12. A forma como a estimativa foi feita leva em consideração o possível efeito de matriz na etapa de extração por MEPS, assim como no método cromatográfico. Pelos dados apresentados na Tabela 12, é possível verificar que o efeito de matriz, pode apresentar uma pequena contribuição para a diminuição do sinal analítico, principalmente para os compostos atrazina e bifentrina.

Tabela 12 - Avaliação do efeito de matriz. Quanto menor o valor da tabela, maior a contribuição do efeito matriz para o composto.

Composto	(Área_{matriz} / Área_{água}) x 100
Tebutiurum	97,6
Carbofurano	96,5
Atrazina	79,2
Metribuzim	91,8
Ametrina	84,1
Bifentrina	77,3

4.8.3 Linearidade

Na avaliação da linearidade, utilizou-se primeiramente a aplicação do modelo linear sem ponderação ($w=1$), como descrito no item 3.4.9.3. O modelo sem ponderação não apresentou homocedasticidade, conforme é evidenciado nos gráficos dos resíduos (Figura 23); e também comprovado pelo teste F, onde o F_{exp} para todos os compostos em estudo foi maior que o $F_t(4;4;0,99)$, que é 15,98. A Tabela 13 apresenta a compilação desses resultados e a faixa linear de trabalho. Observando-se a Figura 23, é possível verificar a melhora da dispersão dos resíduos dos modelos ponderados em relação ao não ponderado.

Tabela 13 - Soma dos resíduos (%), teste F e faixa linear de trabalho. Dados usados na avaliação da homocedasticidade do modelo linear sem ponderação.

Composto	Soma dos Resíduos (%)	F_{exp}	$F_{\text{exp}}/F_{\text{tab}}$	Faixa linear de trabalho*
Tebutiurum	251,7	3398,8	212,8	10-1000
Carbofurano	-222,6	1007,0	63,1	2-200
Atrazina	-159,7	734,9	46,0	2-200
Metribuzim	-190,4	2869,5	179,7	3-300
Ametrina	-147,2	1690,4	105,8	2-200
Bifentrina	-379,0	4393,1	275,1	2-200

*Concentração em $\mu\text{g/L}$

Figura 23 - Gráficos de resíduos x concentração dos analitos em estudo. À esquerda gráficos do modelo sem ponderação; a direita os gráficos dos modelos ponderados que apresentaram melhora na soma dos resíduos e no R^2 . (continua)

Figura 23 (Conclusão) - Gráficos de resíduos x concentração dos analitos em estudo. À esquerda gráficos do modelo sem ponderação; à direita os gráficos dos modelos ponderados que apresentaram melhora na soma dos resíduos e no R^2 .

A Tabela 14 apresenta as soma dos resíduos (%); os coeficientes angular (b), linear (a) e de determinação (R^2) das calibrações ponderadas. Nela é verificado que o peso x^{-2} foi o que apresentou a menor soma de resíduos, porém, houve uma diminuição do R^2 em relação ao modelo sem ponderação ($w=1$). Por esse motivo, escolheu-se o peso x^{-1} , o qual melhora a soma dos resíduos e o R^2 em relação ao modelo sem ponderação ($w=1$). A única exceção foi a bifentrina, em que foi utilizado o peso x^{-2} ; pois no peso x^{-1} , alguns resíduos ficaram muito altos (acima de 30% e -40%). A Figura 24 mostra a plotagem dos dados em função da concentração utilizando o peso escolhido para cada composto.

Tabela 14 - Soma dos resíduos (%), coeficientes angular (b), linear (a) e de determinação (R^2) das calibrações ponderadas e da não ponderada. (continua)

Composto	Peso (w)	Soma dos Resíduos (%)	b	a	R^2
Tebutiurum	1	251,7	426,1	-1886,0	0,9902
	x^{-2}	-1,0	429,2	-1032,2	0,9837
	x^{-1}	-5,7	423,2	-782,2	0,9923
	$x^{-0,5}$	21,4	424,2	-957,5	0,9927
	y^{-1}	40,6	420,5	-914,5	0,9922
	y^{-2}	80,6	419,9	-1076,7	0,9818
	$y^{-0,5}$	382,2	425,0	-2195,7	0,9914
Composto	Peso (w)	Soma dos Resíduos (%)	b	a	R^2
Carbofurano	1	-222,6	630,5	1634,4	0,9919
	x^{-2}	-0,8	669,7	428,4	0,9851
	x^{-1}	20,1	643,3	647,7	0,9935
	$x^{-0,5}$	-60,6	637,2	943,6	0,9940
	y^{-1}	31,6	639,8	657,0	0,9940
	y^{-2}	51,3	655,6	447,5	0,9877
	$y^{-0,5}$	-245,0	629,3	1753,9	0,9934

Tabela 14 – (conclusão) - Soma dos resíduos (%), coeficientes angular (b), linear (a) e de determinação (R^2) das calibrações ponderadas e da não ponderada.

Composto	Peso (w)	Soma dos Resíduos (%)	b	a	R^2
Atrazina	1	-159,7	521,1	634,5	0,9917
	x^{-2}	0,6	520,3	310,3	0,9824
	x^{-1}	-3	525,9	263,6	0,9934
	$x^{-0,5}$	-25,3	524,4	317,1	0,9938
	y^{-1}	32,5	523,5	227,2	0,9936
	y^{-2}	63,4	512,4	278,2	0,9841
	$y^{-0,5}$	-110	521,6	514	0,9928
Composto	Peso (w)	Soma dos Resíduos (%)	b	a	R^2
Metribuzim	1	-190,4	355,8	857,7	0,9928
	x^{-2}	0,5	357,6	386,7	0,9916
	x^{-1}	-2,4	360,2	354,5	0,9961
	$x^{-0,5}$	-26,5	358,9	418,6	0,9956
	y^{-1}	14,5	359	340,5	0,9959
	y^{-2}	28,8	355,2	368,5	0,9926
	$y^{-0,5}$	-156,5	356,5	753	0,9946
Composto	Peso (w)	Soma dos Resíduos (%)	b	a	R^2
Ametrina	1	-147,2	489,8	1081	0,9834
	x^{-2}	-0,8	516,5	413,5	0,9781
	x^{-1}	22,4	496,2	581,2	0,9896
	$x^{-0,5}$	-54,2	492,1	801,2	0,9891
	y^{-1}	41	491,7	595,1	0,9898
	y^{-2}	68,7	504,1	411	0,9834
	$y^{-0,5}$	-246,3	484,5	1493,7	0,9872
Composto	Peso (w)	Soma dos Resíduos (%)	b	a	R^2
Bifentrina	1	-379	722	2784,8	0,9754
	x^{-2}	-0,7	822,7	-297	0,9713
	x^{-1}	21,1	754,6	267,6	0,9817
	$x^{-0,5}$	-152,7	737,5	1113,5	0,9824
	y^{-1}	107,7	743,8	152,9	0,9821
	y^{-2}	143,5	788,2	-307,3	0,9679
	$y^{-0,5}$	-280,2	725,3	2014,3	0,9788

Figura 24 - Curvas de calibração dos melhores modelos ponderados.

4.8.3 Recuperação/veracidade (exatidão) e eficiência do processo de extração

Os resultados de recuperação/veracidade estão apresentados na Tabela 15, juntamente com a eficiência absoluta do método. Os resultados estão dentro dos critérios de aceitabilidade exigidos no manual de garantia de qualidade do MAPA,⁵⁵ uma vez que o procedimento analítico foi capaz de recuperar, em cada nível de fortificação, de 70% a 120%, em média, para todos os analitos, com uma precisão de $CV \leq 20\%$ (Tabela 16).

Em casos de valores baixos de recuperação, porém com boa precisão, uma recuperação abaixo de 70% pode ser aceitável. Entretanto deve-se preferir nesses casos um método mais exato, quando praticável. A razão para a baixa recuperação é bem estabelecida sendo, normalmente, devida à distribuição do agrotóxico no processo de partição.

Com relação à eficiência de extração, pode-se inferir que ela não atinge neste trabalho os 100%, principalmente devido a dois fatores: interação analito material sorvente e/ou a otimização do MEPS. Neste ultimo caso poderia ter sido incluído mais ciclos de aspiração da amostra, lavagem e eluição, porém, isso demandaria um maior tempo de extração e, como o processo foi realizado manualmente, o método seria inviável na prática. O efeito matriz também tem uma pequena contribuição para que a extração não atinja os 100%, como pode ser observado na Tabela 12.

É valido reforçar que a definição de recuperação/veracidade aqui exposta está relacionada com a exatidão do método. Existem na literatura outras definições , como a de Matuszewski et al.⁶¹, que está relacionada com a recuperação do processo de extração (RE), Equação 9. Matuszewski et al.⁶¹, também, sugerem que a eficiência do processo de extração (PE) pode ser calculada pela Equação 10.

$$RE = \frac{C}{B} \text{ (Eq. 9);} \quad PE = \frac{C}{A} \text{ (Eq. 10)}$$

A – área obtida do padrão em solvente

B - área da matriz fortificada depois da extração

C - área da matriz fortificada antes da extração

Tabela 15 - Resultados de recuperação/veracidade e da eficiência do processo de extração

Composto	concentração (µg/L)	Recuperação/Veracidade (%)	Eficiência do processo de extração(%) $b_{\text{curva}}/b_{\text{solvente}}$
Tebutiurum	15	106,9	43,9
	250	99,8	
	750	88,5	
Carbofurano	3	102,4	64,8
	50	94,9	
	150	88,9	
Atrazina	3	89,5	48,6
	50	91,5	
	150	89,1	
Metribuzim	4,5	97,8	59,5
	75	96,2	
	225	92,0	
Ametrina	3	93,0	44,7
	50	90,4	
	150	94,3	
Bifentrina	3	80,8	27,1
	50	76,0	
	150	71,7	

4.8.4 Precisão (Repetitividade)

Os resultados de precisão (repetitividade) do método estão apresentados na Tabela 16. Os coeficientes de variação (CV) para os níveis de concentração testados atenderam os requisitos exigidos, ou seja, foram menores que 20% para cada nível de concentração avaliado.⁵⁵

Tabela 16 - Precisão expressa pelo coeficientes de variação (CV) intra e inter-dia.

Composto	concentração (ug/L)	CV intra-dia (%)		CV Inter-Dia (%)
		dia1	dia 2	
Tebutiurum	15	14,9	11	12,4
	250	8,9	14	11,1
	750	8,9	8,5	8,6
Carbofurano	3	13,1	15,6	13,6
	50	9,8	5,6	7,9
	150	5,5	5,2	5,4
Atrazina	3	13	9,9	11,2
	50	5,3	6,4	5,9
	150	5,7	4,5	5,6
Metribuzim	4,5	8,9	10,4	9,2
	75	6,7	5,2	5,7
	225	4,6	3,9	5,1
Ametrina	3	15,3	10,4	13,9
	50	8,7	6,5	8,1
	150	5,7	4,9	5,7
Bifentrina	3	12,3	15,9	13,5
	50	8,4	9,7	8,8
	150	9,2	9,8	9,9

4.8.5 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

O LOD e LOQ do método foram determinados de acordo com o item 3.4.9.5 e são mostrados na Tabela 17, onde também há valores de LOQ de um método desenvolvido para determinação dos mesmos agrotóxicos em garapa por SBSE.⁸

Os limites de quantificação do método proposto variam de 2-10 µg/L. Comparando os resultados do método desenvolvido por MEPS e o que utilizou SBSE, o tebutiurum e a bifentrina apresentaram menores LOQs para o método desenvolvido por MEPS. Esse fato pode ser atribuído a maior eficiência de extração do processo por MEPS que foi de 43,9% e 27,1%, respectivamente (Tabela 15). Na extração por SBSE o valor médio (levando em conta 3 níveis de concentração) foi de 29,5% e 0,2% para o tebutiurum e bifentrina, respectivamente.⁸ Para os outros agrotóxicos, embora os valores de limite de quantificação sejam próximos, o método por SBSE teve melhores resultados principalmente devido ao maior fator de

concentração 37,5 vezes (7,5 mL de amostra dessorvidos em 0,2 mL de solvente), que ele proporcionava, lembrando que, no método desenvolvido nesse trabalho, o fator de concentração foi de 8,3 vezes.

Tabela 17 - Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Composto	LOD*	LOQ *	LOQ por SBSE⁸
Tebutiurum	1,5	10	40
Carbofurano	0,3	2	0,5
Atrazina	0,3	2	0,5
Metribuzim	0,8	3	1
Ametrina	0,2	2	1
Bifentrina	0,3	2	20

* concentração em (µg/L)

Na Tabela 18 são apresentados os limites de detecção de trabalhos encontrados na literatura, utilizando diferentes técnicas de extração que, também, analisaram agrotóxicos em garapa. É possível notar que os métodos por MASE e SBSE apresentaram, em alguns casos, LOD com valores bem menores do que o método desenvolvido nesse estudo por MEPS. Para o MASE e SBSE isso pode ser justificado pelo “large volume injection” (LVI) injetado no sistema cromatográfico (100 µL), e utilização de dessorção térmica (TD), aliado ao uso de um sistema GC-MS mais moderno.⁷

Tabela 18 - Limites de detecção (LOD) encontrados na literatura de agrotóxicos em garapa.

Técnica de extração-deteção	LOD	Número de agrotóxicos avaliados	Referência
(1) MASE–LVI–GC–MS	0,004-0,56	18	⁷
(2) SBSE–TD–GC–MS	0,002-0,71	18	⁷
(3) QuEChERS-LC-ESI-MS-MS	0,83-16	10	⁵
(4) QuEChERS-GC-ECD	3-40	7	⁶²

* concentração em (µg/L).

4.8.6 Robustez

Com resultados obtidos dos experimentos de otimização do processo de extração, é possível avaliar quais parâmetros devem ser controlados com mais cuidado. Dentre os avaliados, deve-se atentar para os ciclos de aspiração e lavagem da amostra, solvente de eluição e volume do solvente de eluição. Já os parâmetros pH da amostra, força iônica do meio e número de ciclos de eluição da amostra não apresentaram influências significativas, dentro dos níveis avaliados, no processo de extração por MEPS.

4.9 Aplicação do método em amostras reais de garapa

Para aplicação do método foram adquiridas amostras nas cidades de Cerquilha, Diadema e São Carlos (duas amostras nesse caso). As amostras foram transportadas congeladas e tratadas como descrito no item 3.4.2. Foi verificada a presença de atrazina em apenas uma amostra, em concentração próxima ao limite de quantificação. Também, foram detectados resíduos de atrazina, ametrina e bifentrina, abaixo do limite de quantificação, em algumas dessas amostras.

Os valores encontrados estão abaixo dos valores de LMR recomendados pela ANVISA para a cana-de-açúcar, porém, vale ressaltar que não existe uma legislação específica para o LMR desses resíduos em garapa.

Tabela 19 – Resíduos de agrotóxicos encontrados nas amostras de garapas analisadas.

Composto	Amostras (µg/L)			
	Cerquilha	Diadema	São Carlos 1	São Carlos 2
Tebutiurum	-	-	-	-
Carbofurano	-	-	-	-
Atrazina	<LOQ (2µg/L)	<LOQ (2µg/L)	2,5 µg/L	-
Metribuzim	-	-	-	-
Ametrina	-	-	<LOQ (2µg/L)	-
Bifentrina	-	<LOQ (2µg/L)	-	-

(-): Não detectado ; <LOQ: abaixo do limite de detecção

5 CONCLUSÃO

A utilização de planejamento experimental mostrou-se uma ferramenta poderosa para auxiliar o desenvolvimento de um método analítico, pois permite a avaliação de vários fatores e possíveis interações entre eles, realizando um número menor de experimentos que uma otimização univariada.

A aplicação de novos materiais, também é de fundamental importância para o aprimoramento da técnica. Por isso, foi realizada uma tentativa de aplicar o grafeno como material sorvente, ainda sem sucesso devido ao entupimento do BIN provocada pelo grafeno. Talvez, a funcionalização de amino-silica com grafeno seja uma alternativa para a aplicação desse material em MEPS, uma vez que há relatos dessa aplicação em SPE.

O método desenvolvido, MEPS-GC-MS, para determinação de resíduos de agrotóxicos em garapa atendeu aos critérios exigidos pelo MAPA, apresentando seletividade adequada, limites de quantificação entre 2-10 µg/L, faixa linear de trabalho dentro dos LMRs exigidos, recuperação (71,7-106,9%) e coeficientes de variação (CV) menores que 16%. Além disso, permitiu a aplicação, com sucesso, em amostras reais de garapa de diferentes localidades.

REFERÊNCIAS

- 1 COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. Brasília, 2014. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_08_28_08_52_35_boletim_cana_portugues_-_2o_lev_-_2014-15.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2014.
- 2 BARLETTA, J. Y. **Desenvolvimento e aplicação de uma nova fase para extração por sorção barra de agitação (SBSE)**. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- 3 MCGHIE, T. K. Analysis of sugarcane flavonoids by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 634, n. 1, p. 107-112, 1993.
- 4 UNIVERSIDADE DE CAMPINAS (UNICAMP). **Atletas ingerem garapa para repor energia**. Campinas, 2004. Disponível em: <http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/maio2004/ju250pag8a.html>. Acesso em: 7 maio 2014.
- 5 SAMPAIO, M. R. F.; TOMASINI, D.; CARDOSO, L. V.; CALDAS, S. S.; DUARTE, F. A.; PRIMEL, E. G. A method for the determination of multiclass pesticides in sugarcane juice employing QuEChERS and LC-ESI-MS/MS. **Analytical Methods**, v. 5, n. 8, p. 2028-2033, 2013.
- 6 TSENG, S. H.; LIN, Y. J.; CHANG, P. C.; CHOU, S. S.; CHANG, H. M. Determination of simazine residue in sugarcane by application of matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction technique. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 12, n. 1, p. 74-78, 2004.
- 7 ZUIN, V. G.; SCHELLIN, M.; MONTERO, L.; YARIWAKE, J. H.; AUGUSTO, F.; POPP, P. Comparison of stir bar sorptive extraction and membrane-assisted solvent extraction as enrichment techniques for the determination of pesticide and benzo[a]pyrene residues in Brazilian sugarcane juice. **Journal of Chromatography A**, v. 1114, n. 2, p. 180-187, 2006.
- 8 BARLETTA, J. Y.; GOMES, P. C.; DOS SANTOS-NETO, A. J.; LANCAS, F. M. Development of a new stir bar sorptive extraction coating and its application for the determination of six pesticides in sugarcane juice. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 11, p. 1317-1325, 2011.
- 9 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA (ANVISA). **Mercado de agrotóxicos**. 2012 Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu++noticias+anos/2012+noticias/seminario+volta+a+discutir+mercado+de+agrototoxicos+em+2012>>. Acesso em: 01 jun. 2013.

- 10 CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S.; RIZOLLO, A.; MULLER, N. M.; ALEXANDRE, V. P.; FRIEDRICH, K.; MELLO, M. S. Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1. **Agrotóxicos, segurança alimentar e saúde**. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <<http://www.abrasco.org.br/UserFiles/File/ABRASCODIVULGA/2012/DossieAGT.pdf>>. Acesso em: 08 maio 2013.
- 11 CHUNG, S. W. C.; CHAN, B. T. P. Validation and use of a fast sample preparation method and liquid chromatography–tandem mass spectrometry in analysis of ultra-trace levels of 98 organophosphorus pesticide and carbamate residues in a total diet study involving diversified food types. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 29, p. 4815-4824, 2010.
- 12 NUNES, G. S.; TOSCANO, I. A.; BARCELÓ, D. Analysis of pesticides in food and environmental samples by enzyme-linked immunosorbent assays. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 79-87, 1998.
- 13 LIU, J.; YANG, Y.; YANG, Y.; ZHANG, Y.; LIU, W. Disrupting effects of bifenthrin on ovulatory gene expression and prostaglandin synthesis in rat ovarian granulosa cells. **Toxicology**, v. 282, n. 1–2, p. 47-55, 2011.
- 14 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA (ANVISA). **Monografias autorizadas**. 2014. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos>>. Acesso em: 07 maio 2014.
- 15 ANDREU, V.; PICO, Y. Determination of currently used pesticides in biota. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 404, n. 9, p. 2659-2681, 2012.
- 16 HAWTHORNE, S. B.; MILLER, D. J.; PAWLISZYN, J.; ARTHUR, C. L. Solventless determination of caffeine in beverages using solid-phase microextraction with fused-silica fibers. **Journal of Chromatography A**, v. 603, n. 1–2, p. 185-191, 1992.
- 17 QUEIROZ, M. E. C.; MELO, L. P. Selective capillary coating materials for in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography to determine drugs and biomarkers in biological samples: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 826, p. 1-11, 2014.
- 18 RIBEIRO, C.; RIBEIRO, A. R.; MAIA, A. S.; GONÇALVES, V. M. F.; TIRITAN, M. E. New trends in sample preparation techniques for environmental analysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 44, n. 2, p. 142-185, 2014.
- 19 BIANCHIN, J. N.; NARDINI, G.; MERIB, J.; DIAS, A. N.; MARTENDAL, E.; CARASEK, E. Screening of volatile compounds in honey using a new sampling strategy combining multiple extraction temperatures in a single assay by HS-SPME-GC-MS. **Food Chemistry**, v. 145, p. 1061-1065, 2014.

- 20 AUFARTOVÁ, J.; TORRES-PADRÓN, M. E.; SOSA-FERRERA, Z.; NOVÁKOVÁ, L.; SOLICH, P.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J. Development of a novel in-tube solid phase microextraction based on micellar desorption followed by LC-DAD-FD for the determination of some endocrine disruptor compounds in environmental liquid samples. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 37, n. 12, p. 1654-1672, 2014.
- 21 BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; CRAMERS, C. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 11, n. 10, p. 737-747, 1999.
- 22 HE, M.; CHEN, B.; HU, B. Recent developments in stir bar sorptive extraction Microextraction Techniques. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 8, p. 2001-2026, 2014.
- 23 ABDEL-REHIM, M. New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications. **Journal of Chromatography B**, v. 801, n. 2, p. 317-321, 2004.
- 24 ALTUN, Z.; ABDEL-REHIM, M.; BLOMBERG, L. G. New trends in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe (MEPS) for LC and GC applications Part III: Determination and validation of local anaesthetics in human plasma samples using a cation-exchange sorbent, and MEPS-LC-MS-MS. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 813, n. 1-2, p. 129-35, 2004.
- 25 ABDEL-REHIM, M.; DAHLGREN, M.; BLOMBERG, L.; CLAUDE, S.; TABACCHI, R. Microextraction in packed syringe (MEPS) utilizing methylcyanopropyl- silarylene as coating polymer for extraction of drugs in biological samples. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 29, n. 17, p. 2537-2544, 2006.
- 26 LEÇA, J. M.; PEREIRA, V.; PEREIRA, A. C.; MARQUES, J. C. Rapid and sensitive methodology for determination of ethyl carbamate in fortified wines using microextraction by packed sorbent and gas chromatography with mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 811, p. 29-35, 2014.
- 27 JONSSON, S.; HAGBERG, J.; VAN BAVEL, B. Determination of 2,4,6-trichloroanisole and 2,4,6-tribromoanisole in wine using microextraction in packed syringe and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 13, p. 4962-4967, 2008.
- 28 EL-BEQQALI, A.; KUSSAK, A.; ABDEL-REHIM, M. Fast and sensitive environmental analysis utilizing microextraction in packed syringe online with gas chromatography-mass spectrometry - Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1114, n. 2, p. 234-238, 2006.
- 29 SALAMI, F. H.; QUEIROZ, M. E. Microextraction in packed sorbent for the determination of pesticides in honey samples by gas chromatography Coupled to Mass Spectrometry. **Journal of Chromatographic Science**, v. 51, p. 1-6, 2012.

- 30 ANDRADE, F. N.; SANTOS-NETO, A. J.; LANCAS, F. M. Microextraction by packed sorbent liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry of triazines employing a molecularly imprinted polymerdagger. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 21, p. 3150-6, 2014.
- 31 ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 701, n. 2, p. 119-128, 2011.
- 32 PEREIRA, J.; GONÇALVES, J.; ALVES, V.; CÂMARA, J. S. Microextraction using packed sorbent as an effective and high-throughput sample extraction technique: Recent applications and future trends. **Sample Preparation**, v. 1, p. 29-35, 2013.
- 33 BAGHERI, H.; ALIPOUR, N.; AYAZI, Z. Multiresidue determination of pesticides from aquatic media using polyaniline nanowires network as highly efficient sorbent for microextraction in packed syringe. **Analytica Chimica Acta**, v. 740, p. 43-49, 2012.
- 34 BAGHERI, H.; AYAZI, Z.; AGHAKHANI, A.; ALIPOUR, N. Polypyrrole/polyamide electrospun-based sorbent for microextraction in packed syringe of organophosphorous pesticides from aquatic samples. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 1, p. 114-120, 2012.
- 35 BAGHERI, H.; AYAZI, Z.; ES'HAGHI, A.; AGHAKHANI, A. Reinforced polydiphenylamine nanocomposite for microextraction in packed syringe of various pesticides. **Journal of Chromatography A**, v. 1222, p. 13-21, 2012.
- 36 WUEST, J. D.; ROCHEFORT, A. Strong adsorption of aminotriazines on graphene. **Chemical Communications**, v. 46, n. 17, p. 2923-2925, 2010.
- 37 CHEN, J. M.; ZOU, J.; ZENG, J. B.; SONG, X. H.; JI, J. J.; WANG, Y. R.; HA, J.; CHEN, X. Preparation and evaluation of graphene-coated solid-phase microextraction fiber. **Analytica Chimica Acta**, v. 678, n. 1, p. 44-49, 2010.
- 38 LUO, Y. B.; YUAN, B. F.; YU, Q. W.; FENG, Y. Q. Substrateless graphene fiber: A sorbent for solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1268, p. 9-15, 2012.
- 39 WU, Q. H.; FENG, C.; ZHAO, G. Y.; WANG, C.; WANG, Z. Graphene-coated fiber for solid-phase microextraction of triazine herbicides in water samples. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 2, p. 193-199, 2012.
- 40 WU, X.; ZHANG, H.; MENG, L.; LIU, X.; MA, Y. Graphene for cleanup in trace analysis of pyrethroid Insecticides in cucumber and spinach. **Chromatographia**, v. 75, n. 19-20, p. 1177-1183, 2012.
- 41 LIU, Q.; CHENG, M.; LONG, Y.; YU, M.; WANG, T.; JIANG, G. Graphenized pencil lead fiber: Facile preparation and application in solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1325, p. 1-7, 2014.

- 42 LUO, Y. B.; CHENG, J. S.; MA, Q. A.; FENG, Y. Q.; LI, J. H. Graphene-polymer composite: extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from water samples by stir rod sorptive extraction. **Analytical Methods**, v. 3, n. 1, p. 92-98, 2011.
- 43 LIU, Q.; SHI, J.; JIANG, G. Application of graphene in analytical sample preparation. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 1-11, 2012.
- 44 GENGLER, R. Y. N.; SPYROU, K.; RUDOLF, P. A roadmap to high quality chemically prepared graphene. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 43, n. 37, p. 374015, 2010.
- 45 HUMMERS JUNIOR, W.S.; OFFEMAN, R.E. Preparation of graphitic oxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 60, p. 1339, 1958.
- 46 HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6ª ed. Porto Alegre: BOOKMAN, 2009. 1056p.
- 47 TUINSTRA, F. Raman spectrum of graphite. **The Journal of Chemical Physics**, v. 53, n. 3, p. 1126, 1970.
- 48 BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; BARROS NETO, B. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4ª ed. Porto Alegre: BOOKMAN, 2010. 414p.
- 49 MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**: 5th ed. New York: John Wiley , 2001. 684p.
- 50 SANTOS-NETO, A. J. LANÇAS, F. M. ; CONTADORI, A. ; ORTEGA, S. N. ; AMPARO, M. R. **Microdispositivo de extração desmontável para adaptação a microseringas de agulha removível**. BR n. PI 1020130254517, 09 nov. 2014.
- 51 CHEN, Y.; ZHANG, X.; YU, P.; MA, Y. Stable dispersions of graphene and highly conducting graphene films: a new approach to creating colloids of graphene monolayers. **Chemical Communications**, n. 30, p. 4527-4529, 2009.
- 52 RAO, C. N. R.; BISWAS, K.; SUBRAHMANYAM, K. S.; GOVINDARAJ, A. Graphene, the new nanocarbon. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 17, p. 2457, 2009.
- 53 STANKOVICH, S.; DIKIN, D. A.; PINER, R. D.; KOHLHAAS, K. A.; KLEINHAMMES, A.; JIA, Y.; WU, Y.; NGUYEN, S. T.; RUOFF, R. S. Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. **Carbon**, v. 45, n. 7, p. 1558-1565, 2007.
- 54 TOMLIN, C. **The Pesticide manual : a world compendium incorporating the agrochemicals handbook**. 10 th ed. Farnham, Surrey: 1994 British Crop Protection Council Cambridge : Royal Society of Chemistry, Information Sciences, c1994. 1341p.

55 Brasil. Ministério da agricultura pecuária e abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual de garantia da qualidade Analítica**. Brasília: MAPA/ACS, 2011. 227p.

56 ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B**, v. 774, n. 2, p. 215-222, 2002.

57 LANCHOTE, V. L.; BONATO, P. S.; CERDEIRA, A. L.; SANTOS, N. A. G.; DE CARVALHO, D.; GOMES, M. A. HPLC screening and GC-MS confirmation of triazine herbicides residues in drinking water from sugar cane area in Brazil. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 118, n. 3-4, p. 329-337, 2000.

58 LIU, X.; ZHANG, H.; MA, Y.; WU, X.; MENG, L.; GUO, Y.; YU, G.; LIU, Y. Graphene-coated silica as a highly efficient sorbent for residual organophosphorus pesticides in water. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 1, n. 5, p. 1875-1884, 2013.

59 ZHANG, X.; CHEN, S.; HAN, Q.; DING, M. Preparation and retention mechanism study of graphene and graphene oxide bonded silica microspheres as stationary phases for high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1307, p. 135-143, 2013.

60 LIU, Q.; SHI, J.; SUN, J.; WANG, T.; ZENG, L.; JIANG, G. Graphene and graphene oxide sheets supported on silica as versatile and high-performance adsorbents for solid-phase extraction. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 26, p. 5913-5917, 2011.

61 MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 13, p. 3019-3030, 2003.

62 FURLANI, R. P. Z.; MARCILIO, K. M.; LEME, F. M.; TFOUNI, S. A. V. Analysis of pesticide residues in sugarcane juice using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with electron capture detection. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1283-1287, 2011.