UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP

Instituto de Química de São Carlos - IQSC

FELIPE NASCIMENTO ANDRADE

**Síntese e emprego de polímeros molecularmente impressos
em técnicas miniaturizadas acopladas a cromatografia
liquida para análises de triazinas e sulfoniluréias em
amostras de milho**

São Carlos

2015

FELIPE NASCIMENTO ANDRADE

**Síntese e emprego de polímeros molecularmente impressos
em técnicas miniaturizadas acopladas a cromatografia
liquida para análises de triazinas e sulfoniluréias em
amostras de milho**

Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Química
de São Carlos da Universidade de São Paulo como
parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor
em Química.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

São Carlos

2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por mais uma conquista.

Ao Instituto de Química de São Carlos pela oportunidade concedida.

Ao professor Fernando Mauro Lanças, por ter me recebido no grupo de cromatografia, pelas oportunidades, apoio e pelos conhecimentos repassados durante todo o desenvolvimento do trabalho, contribuindo para meu crescimento profissional.

Ao professor Álvaro, pelas discussões e sempre disposto a contribuir para o desenvolvimento do trabalho.

Ao professor José Manuel F. Nogueira pela acolhida e colaboração do trabalho realizado em seu laboratório.

Aos professores, Diogo Teixeira Carvalho, Larissa Soares Amaral e Lázaro Moscardini D' Assunção pela amizade, apoio e pelas contribuições à minha formação acadêmica.

À Odete, por ser sempre prestativa, amiga e paciente, sempre disposta a nos ajudar.

À todos os alunos do Grupo de Cromatografia, a Elaine e Guilherme, pela amizade, momentos descontraídos, viagens e auxílio durante o doutorado.

A todos os GRANDES amigos que fiz nesta cidade, por tornarem meus dias mais agradáveis e felizes: Adriel, Andréia, Bruno, Carol, Daiane, Daniel, Fran, João, Lucas, Luiz Felipe, Matheus, Maraissa, Maura, Meire, Pedro, Rodolfo, Rodrigo e Tanare, os quais levarei comigo do lado esquerdo do peito. Vocês foram os principais suportes durante minha jornada nesta cidade, grande família que me proporcionou excelentes momentos de descontração e companheirismo.

Em especial as brasileiras que foram fundamentais no período que vivi em Lisboa; à Alessandra, que me auxiliou desde o início. Obrigado pela amizade, ensinamentos, dicas da cidade e todos momentos compartilhados. À Gabriela, pelas risadas, aventuras e convivência diária no laboratório.

Ao Gabriel, um irmão que a vida me proporcionou, pela amizade, carinho e paciência. Apesar da distância esteve sempre presente.

Aos meus queridos irmãos pela amizade e companheirismo. E minhas primas Isabella e Laís, pela torcida e por sempre me apoiarem nos meus sonhos.

À FAPESP pelas bolsas de doutorado e BEPE concedidas (2011/09898-4 e 2014/20424-2), sem as quais não seria possível a realização desse trabalho.

E um agradecimento muito especial àqueles que foram, são e sempre serão os principais responsáveis por chegar onde cheguei: meus pais, Gil e Wanda. Agradeço a vocês todo amor, carinho, apoio, incentivo, compreensão, dedicação e auxílio desde a graduação e por muitas vezes terem desistido de seus próprios sonhos para realizarem o meu – AMO VOCÊS.

*“O que prevemos raramente ocorre;
o que menos esperamos geralmente acontece.”
(Benjamin Disraeli)*

RESUMO

As triazinas e sulfoniluréias tem sido muito empregadas, devido ao crescente aumento na produção agrícola e aplicação de herbicidas nas lavouras, podendo causar sérios riscos à saúde humana e ao meio ambiente. Uma problemática é a baixa concentração que estes analitos são encontrados, tornando-se necessário o emprego do preparo da amostra para a sua determinação. Com isso, a busca por técnicas de preparo de amostras miniaturizadas, simples, de baixo custo, com menores riscos de contaminações ambientais e baixo consumo de solventes, tem grande predominância. Dentre as microtécnicas de preparo de amostra podemos destacar a microextração em dispositivos preenchidos com sorventes (MEPS, do inglês, *Microextraction by Packed Sorbent*) e a microextração adsorptiva em barra (BA μ E, do inglês, *Bar Adsorptive Microextraction*). Outro aspecto desejado no preparo de amostras é a obtenção de uma maior seletividade quanto ao sorvente empregado, quando comparado àqueles convencionais como, por exemplo, sílica modificada (ex. C18), resinas Amberlite XAD, entre outros. Nesse âmbito, o presente trabalho apresenta a síntese de dois polímeros impressos molecularmente (MIP, do inglês, *Molecularly Imprinted Polymers*) e suas aplicações na adsorção seletiva de moléculas de triazinas e sulfoniluréias, com separação, identificação e quantificação feitas por LC-TOF-ESI e HPLC-DAD. A primeira metodologia desenvolvida foi a síntese dos polímeros impressos empregando o ácido metacrílico e o etileno glicol dimetacrilato. Após a síntese, os polímeros foram caracterizados através da espectroscopia de infravermelho e microscopia eletrônica de varredura. O coeficiente de seletividade para o MIP foi comparado com o coeficiente de seletividade do polímero não impresso (NIP, do inglês, *non imprinted polymers*) para misturas binárias de atrazina/picloram, atrazina/propanil, bensulfuron/betazon e bensulfuron/prometon onde os valores dos coeficientes de seletividade relativa (k') obtidos foram de 17,2, 3,2, 10,6 e 8,5. A seguir, foram desenvolvidos dois métodos empregando MEPS para as triazinas e sulfoniluréias, respectivamente. Os métodos validados baseando-se nas recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e com diretrizes da Comunidade Europeia, apresentaram linearidade, seletividade, precisão, exatidão e recuperação adequadas para as triazinas e sulfoniluréias. Os limites de quantificação obtidos foram da ordem de 5,0-10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para as triazinas e 2,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para as sulfoniluréias. Ainda com propósito de determinar esses herbicidas em milho, dois novos métodos de preparo de amostra foram desenvolvidos, empregando a BA μ E. A BA μ E, foi desenvolvida recentemente e combinada com os polímeros molecularmente impressos, avaliou-se sua determinação para as triazinas e sulfoniluréias. As variáveis da técnica BA μ E foram otimizadas e, em seguida, validadas. Os limites de quantificação obtidos foram da ordem de 0,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para as triazinas e 0,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para as sulfoniluréias. Os métodos propostos foram aplicados com sucesso para determinação de triazinas em diferentes amostras de milho verde, com valores de recuperação satisfatórios na faixa de 80,0 -120,9%.

ABSTRACT

Triazines and sulfonylureas have been much used due to the growing in agricultural production and application of herbicides on crops, which may cause serious risks to human health and the environment. One problem is the low concentration found of these analytes, making it necessary the use of the sample preparation. Thus, the search for miniaturized sample preparation such as techniques simple, low cost, with less risk of environmental contamination and low solvent consumes has great predominance. Among the sample preparation microtechnology we can highlight the microextraction by packed sorbent (MEPS) and bar adsorptive microextraction (BA μ E). Another desired aspect for sample preparation is to obtain a higher selectivity concerning the sorbent employed as compared to their conventional format; for example, modified silica (ex. 18), Amberlite XAD resins, and others. In this context, this paper presents the synthesis of two molecularly imprinted polymers (MIPs) and their applications in the selective adsorption of triazines and sulfonylureas molecules being the separation, identification and quantification steps made by LC-TOF-ESI and HPLC-DAD. The first step developed was the synthesis of imprinted polymers using methacrylic acid and ethylene glycol dimethacrylate. After synthesizing, the polymers were characterized by infrared spectroscopy and scanning electron microscopy. The MIP selectivity coefficient was compared with the NIP (*non imprinted polymer*) selectivity coefficient employing binary mixtures of atrazine / picloram, atrazine / propanil, bensulfuron / betazon and bensulfuron / prometon where the values of relative selectivity coefficients (k') obtained were 17.2, 3.2, 10.6 and 8.5. Next, we developed two methods for MEPS triazines and sulfonylureas, respectively. The methods were validated based on the recommendations of the National Health Surveillance Agency (ANVISA) and the European Community directives, and presented linearity, selectivity, precision, accuracy and adequate recovery for the triazines and sulfoniurías. The quantification limits were obtained in the range of 5.0-10.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for triazines and 2.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for sulfonylureas. Aiming determining these herbicides in corn samples, two new sample preparation methods were developed, using the BA μ E. The recently developed BA μ E, was combined with molecularly imprinted polymers to evaluate the determination to triazines and sulfonylureas. The BA μ E variables were optimized and validated. The quantification limits were obtained in the range of 0.7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for triazines and 0.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for sulfonylureas. The proposed methods were successfully applied for the determination of triazines in different samples of corn, with satisfactory recovery values in the range of 80.0 -120.9%.

LISTA DE ABREVIATURAS

μ LD – Micro liquid desorption

ACN – Acetonitrila

ALS - Acetolactato sintase

ANOVA – Análise de variância

ANVISA - Agencia nacional de vigilância sanitária

ASE - Accelerated solvent extraction

BA μ E - Bar adsorptive microextraction

BIN - Barrel insert and needle

DPR – Desvio padrão relativo

DVB – Divinilbenzeno

EC - Capillary electrophoresis

EU - União Europeia

FTIR - Fourier transform infrared spectroscopy

GC – Gas chromatography

HAc – Ácido acético

HCl – Ácido clorídrico

HPLC – High performance liquid chromatography

HPLC-DAD - High-performance liquid chromatography with diode-array detection

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IQSC – Instituto de Química de São Carlos

k – Coeficiente de seletividade

k' – Coeficiente de seletividade relativo

KBr – Brometo de potássio

Kd – Coeficiente de distribuição

LC-ESI-ToF – Liquid chromatography – electrospray ionization – time of flight

LD – Limite de detecção

LD – Liquid desorption

LLE - Liquid liquid extraction

LMR – Limite máximo de resíduos

LQ – Limite de quantificação

MAE – Microwave assisted extraction

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeOH – Metanol

MEPS - Microextraction by packed sorbent

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MIP – Molecularly imprinted polymers

MSPD - Matrix solid phase dispersion

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

NIP – Non imprinted polymers

PMDS – Polydimethylsiloxane

SBSE - Stir Bar sorptive extraction

S_{Di} – Desvio padrão das diferenças

SFE - Supercritical fluid extraction

SPE – Solid phase extraction

SPME – Solid phase microextraction

UV- Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Herbicidas da classe das triazinas	20
Figura 2 - Herbicidas da classe das sulfoniluréias	21
Figura 3 - Representação esquemática exemplificando os modos de operação da microextração por flutuação (a) Dessorção por DL (b) usados na técnica BAμE . 1 - Frasco de amostragem; 2 - Vortex; 3 - Amostra; 4 - Barra de agitação magnética em Teflon; 5 – Dispositivo de BAμE; 6- Vial; 7 – solvente DL.....	23
Figura 4 - Representação esquemática da serinfa de MEPS.....	25
Figura 5 - Esquema das etapas de extração empregadas em MEPS.....	25
Figura 6 - Esquema da síntese dos polímeros impressos. a) monômeros funcionais, b) agente de ligação cruzada, c) Analito (molde); 1) os monômeros funcionais são complexados a molécula molde. 2) Co-polimerização entre os monômeros funcionais e o agente de ligação cruzada. 3) Após a polimerização ocorre a formação da rede polimérica em torno do molde. 4) Remoção do molde, deixando o polímero com as cavidades seletivas.....	27
Figura 7 - Exemplos de reagentes de ligação cruzada utilizados na impressão molecular. 1) p-divinilbenzeno (DVB), 2) 1,3-diisopropenil benzeno (DIP), 3) etileno glicol dimetacrilato (EGDMA), 4) N,O-bisacrilol-L-fenilalaninol, 5) 1,4 fenilenodiacrilamida, 6) N,N – fenilendiacrilamida	28
Figura 8 - Exemplos de iniciadores radiculares empregados na impressão molecular: 1) 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN); 2) azo-bis-dimetilvaleronitrila (ABDV); 3) dimetilacetal de benzíla; 4) peróxido de benzoíla (BPO) e 5) ácido 4,4'-azo-bis (4-ciano pentaenóico).	29
Figura 9 - Esquema de síntese para obtenção do polímero para a classe das triazinas.	38
Figura 10 - Esquema de síntese para obtenção do polímero para a classe das sulfoniluréias.	39
Figura 11 - Espectro de infravermelho para os polímeros MIP e NIP.....	41
Figura 12 - Imagem da microscopia eletrônica de varredura do MIP (A e C) NIP (B e D), das triazinas e sulfoniluréias respectivamente, com ampliação de 5.000 vezes para (A e B) e de 10.000 vezes para (C e D).	42
Figura 13 - Diagrama de Pareto do planejamento fatorial 2^{4-1}	54
Figura 14 - Superfície de resposta relacionando A(Amostragem x Condicionamento) B (Eluição x Amostragem e C (Eluição x Condicionamento)	56
Figura 15 - Curvas analíticas para as triazinas processadas por MEPS-MIP	57
Figura 16 - Gráfico de resíduos gerados para as triazinas em MEPS-MIP	59
Figura 17 - Efeito dos parâmetros avaliados na robustez para as triazinas	65
Figura 18 - Cromatograma da separação cromatográfica por LC-ESI-ToF. (A) mistura de padrão de herbicidas da classe das triazinas ($50 \mu\text{g L}^{-1}$). (B), eluato de uma amostra de milho ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$) após extração por MEPS-MIP	66
Figura 19 - Diagrama de Pareto do planejamento completo 2^3	67
Figura 20 - Teste univariado de influência do volume de eluição.....	68
Figura 21 - Curvas analíticas para as sulfoniluréias processadas por MEPS-MIP.....	69
Figura 22 - Gráfico de resíduos gerados para as sulfoniluréias em MEPS-MIP.....	70
Figura 23 - Efeito dos parâmetros avaliados na robustez para MEPS-MIP das sulfoniluréias.....	74
Figura 24 - Cromatograma da separação cromatográfica por LC-ESI-ToF.....	75
Figura 25 - Comparação entre os MIPs sintetizados com outros sorventes comercialmente disponíveis.....	76

Figura 26 - Recuperações médias obtidas: (a) no estudo do solvente para dessorção em meio aquoso; (b) no estudo do tempo para dessorção; Condições - extração: 25 mL ($8,0 \mu\text{g L}^{-1}$), 1000 rpm, 16 h, pH 5,5; μLD .	85
Figura 27 - Recuperações médias obtidas: (a) no estudo de velocidade de agitação; (b) no estudo de tempo de equilíbrio. Condições - extração: 25 mL ($8,0 \mu\text{g L}^{-1}$), 16 h, pH 5,5; μLD : 200 μL MeOH durante 60 min sob banho ultrassônico.	86
Figura 28 - Recuperações médias obtidas: (a) no estudo de pH; (b) adição NaCl; (c) adição MeOH. Condições extração: 25 mL ($8,0 \mu\text{g L}^{-1}$), 1000 rpm, 16 h, μLD : 200 μL MeOH durante 60 min sob tratamento ultrassônico.	87
Figura 29 - Linearidade do método Ba μ E(MIP)- μLD /HPLC-DAD em água ultrapura	88
Figura 30 - Linearidade do método Ba μ E(MIP)- μLD /HPLC-DAD em milho	89
Figura 31 - Gráfico de resíduos do método Ba μ E(MIP)- μLD /HPLC-DAD	90
Figura 32 - Cromatograma obtido através da separação das triazinas empregando HPLC-DAD, AMT (1), SMZ (2), ATZ (3), TER (4).	92
Figura 33 - Recuperações médias obtidas: (a) no estudo do solvente para dessorção em meio aquoso; (b) no estudo do tempo para dessorção; Condições - extração: 25 mL ($8,0 \mu\text{g L}^{-1}$), 1000 rpm, 16 h, pH 5,5; μLD .	93
Figura 34 - Recuperações médias obtidas: (a) no estudo de velocidade de agitação; (b) no estudo de tempo de equilíbrio. Condições - extração: 25 mL ($8,0 \mu\text{g L}^{-1}$), 16 h, pH 5,5; μLD : 200 μL MeOH durante 60 min sob banho ultrassônico.	93
Figura 35 - Recuperações médias obtidas: (a) no estudo de pH; (b) adição NaCl; (c) adição MeOH. Condições extração: 25 mL ($8,0 \mu\text{g L}^{-1}$), 1000 rpm, 16 h, μLD : 200 μL MeOH durante 60 min sob tratamento ultrassônico.	94
Figura 36 - Linearidade do método Ba μ E(MIP2)- μLD /HPLC-DAD em água ultrapura	96
Figura 37 - Linearidade do método Ba μ E(MIP2)- μLD /HPLC-DAD em milho	96
Figura 38 - Gráfico de resíduos do método Ba μ E(MIP2)- μLD /HPLC-DAD.	97
Figura 39 - Cromatograma obtido através da separação das sulfoniluréias empregando HPLC-DAD, thifensulfuron (1), clorosulfuron (2), tribenuron (3), bensulfuron (4).	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Monômeros tipicamente usados no preparo dos MIP.....	27
Tabela 2 - Exemplos do emprego de MIP em diversas técnicas de preparo da amostra.....	30
Tabela 3 - Principais comprimentos de onda obtido para os MIPs.....	41
Tabela 4 - Parâmetros relacionados ao efeito de impressão (K_d , k , k').....	43
Tabela 5 - Matriz de Youden.....	51
Tabela 6 - Variáveis e dados obtidos do planejamento fatorial 2^{4-1}	53
Tabela 7 - Valores obtidos do planejamento composto central 2^3	56
Tabela 8 - Dados obtidos das faixas de linearidade do método curva analítica MEPS-MIP para as triazinas estudadas.....	58
Tabela 9 - Precisões obtidas para o método MEPS-MIP desenvolvido para as triazinas.....	60
Tabela 10 - Exatidões obtidas para o método MEPS-MIP desenvolvido para as triazinas para as triazinas.....	61
Tabela 11 - Recuperações obtidas para o método MEPS-MIP para triazinas.....	62
Tabela 12 - Avaliação do efeito matriz para método de MEPS-MIP.....	62
Tabela 13 - Resultados da reprodutibilidade intralaboratorial para método de MEPS-MIP....	63
Tabela 14 - Fatores avaliados na robustez do método MEPS-MIP para as triazinas.....	64
Tabela 15 - Resultados da avaliação da robustez para método MEPS-MIP para as triazinas..	64
Tabela 16 - Variáveis e dados obtidos do planejamento completo 2^3	67
Tabela 17 - Dados obtidos das faixas de linearidade do método curva analítica MEPS-MIP para as sulfoniluréias estudadas.....	69
Tabela 18 - Precisões obtidas para o método MEPS-MIP desenvolvido para sulfonilúreias...	71
Tabela 19 - Exatidões obtidas para o método MEPS-MIP desenvolvido para sulfonilúreia....	71
Tabela 20 - Resultados da reprodutibilidade intralaboratorial para método de MIP-MEPS desenvolvido para as sulfoniluréias.....	72
Tabela 21 - Valores de efeito matriz do método MEPS-MIP desenvolvido para as sulfoniluréias.....	73
Tabela 22 - Fatores avaliados na robustez do método MEPS-MIP desenvolvido para as sulfoniluréias.....	73
Tabela 23 - Resultados da avaliação da robustez para método MEPS.....	73
Tabela 24 - Recuperação triazinas empregando MEPS-MIP para as triazinas ($n = 5$).....	77
Tabela 25 - Recuperação triazinas empregando MEPS-MIP para as sulfoniluréias ($n = 5$).....	77
Tabela 26 - Dados obtidos das faixas de linearidade do método curva analítica BaμE(MIP) para as triazinas estudadas.....	89
Tabela 27 - Precisões obtidas para o método BaμE(MIP) para as triazinas estudadas.....	91
Tabela 28 - Exatidões obtidas para o método BaμE(MIP) para as triazinas estudadas.....	91
Tabela 29 - Valores de efeito matriz do método BaμE(MIP) para as triazinas.....	92
Tabela 30 - Dados obtidos das faixas de linearidade do método curva analítica BaμE(MIP2) para as sulfoniluréias estudadas.....	97
Tabela 31- Precisões obtidas para o método BaμE(MIP2) para as sulfoniluréias estudadas...	98
Tabela 32 -Exatidões obtidas para o método BaμE(MIP2) para as sulfoniluréias estudadas.	99
Tabela 33 - Valores de efeito matriz do método BaμE(MIP2) para as sulfoniluréias.....	99
Tabela 34 - Recuperação de triazinas empregando BAμE(MIP)–μLD/HPLC-DAD.....	101
Tabela 35 - Recuperação de sulfoniluréias empregando BAμE(MIP2)–μLD/HPLC-DAD..	102
Tabela 36 - Comparação entre fatores de maior vantagem entre BAuE e MEPS.....	105

SUMÁRIO

Capítulo 1	17
Revisão Bibliográfica	17
1.1 Milho.....	18
1.2 Agrotóxicos.....	18
1.2.1 Triazinas.....	19
1.2.2 Sulfoniluréias	20
1.3 Técnicas de preparo de amostra	21
1.3.1 Microextração adsorptiva em barra	22
1.3.2 Microextração em Dispositivos Preenchidos com Sorvente.....	24
1.4 Polímeros Molecularmente Impressos	26
REFERÊNCIAS.....	30
Capítulo 2	36
Síntese, caracterização e seletividade dos MIPs.....	36
1 Objetivos	37
1.1 Geral.....	37
1.2 Específicos	37
2 Material e métodos	37
2.1 Padrões e reagentes	37
2.2 Síntese e caracterização do MIP e NIP	38
2.3 Caracterização dos MIPs	39
2.4 Avaliação do efeito de impressão no MIP	39
Resultados e Discussões.....	40
3.1 Espectros vibracionais na região do infravermelho	40
3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	42
3.4 Teste de Seletividade	43
4 Conclusão	44
REFERÊNCIAS	45
Capítulo 3	46
<i>Microextração em Dispositivos Preenchidos com Sorvente - MEPS</i>	46
1 Objetivos	47
1.1 Geral.....	47
1.2 Específicos	47
2 Material e métodos	47

2.1 Padrões e Reagentes.....	47
2.2 Análises em LC-ESI-ToF	48
2.3 Preparação dos dispositivos para microextração – MEPS	49
2.4 Otimização da eficiência da MEPS.....	49
2.5 Validação do método	50
3 Resultados e discussões.....	52
3.1.1 Otimização multivariada empregando MEPS-MIP para as triazinas	52
3.1.2 Otimização utilizando planejamento de composto central	55
3.1.3 Validação do método MEPS-MIP para as triazinas.....	57
3.2 Método MEPS-MIP desenvolvido para as sulfoniluréias.....	66
3.2.1 Otimização multivariada empregando MEPS-MIP para as sulfoniluréias	66
3.2.2 Validação do método MEPS-MIP para as sulfoniluréias	68
3.3 Comparação do método MEPS-MIP com outros sorventes comercialmente disponíveis	75
3.4 Aplicação em amostras de milho	76
4 Conclusão	78
REFERÊNCIAS	78
Capítulo 4	80
<i>Microextração Adsorativa em Barra - BAμE</i>	80
1 Objetivos	81
1.1 Geral.....	81
1.2 Específicos	81
2 Parte Experimental.....	81
2.1 Padrões e Reagentes.....	81
2.2 Análises em HPLC-DAD.....	82
2.3 Preparação dos dispositivos para microextração – BAμE	82
2.4 Procedimento para extração	83
2.5 Procedimento para dessorção.....	83
2.6 Otimização da eficiência da BAμE.....	84
2.7 Emprego de BAμE na análise de triazinas e sulfoniluréias em amostras de milho	84
3 Resultados e discussões.....	84
3.1 Método BAμE(MIP) desenvolvido para as triazinas	84
3.1.1 Estudo do efeito dos parâmetros da BAμE(MIP)-LD.....	84
3.2 Validação do método proposto para as triazinas.....	88
3.3 Método BAμE(MIP2) desenvolvido para as sulfoniluréias.....	92

3.4 Validação do método proposto para as sulfoniluréias	95
4 Conclusão	102
REFERÊNCIAS	103
Capítulo 5	104
Conclusão Geral	104

PREFÁCIO

O presente trabalho tem como propósito desenvolver e aplicar novas metodologias analíticas miniaturizadas, que proporcionem menor consumo de solvente e uma eficiente extração dos herbicidas em estudo. Para alcançar esses objetivos, primeiramente deve-se escolher o sorvente a ser empregado, a fim de que esse material tenha uma excelente afinidade com os analitos e, também, seja seletivo, ajudando na eliminação de interferentes. Sendo assim, neste trabalho foi empregada a tecnologia da impressão molecular, visando obter materiais mais seletivos. Combinado a esses materiais, foram empregados duas microtécnicas de preparo de amostra, sendo elas, a MEPS e BAμE, ambas em concordância com os princípios da química verde.

Para fins didáticos, essa tese foi dividida em capítulos visando facilitar a compreensão das estratégias e metodologias empregadas, bem como os resultados obtidos.

O capítulo 1 apresenta, de forma sucinta, os fundamentos teóricos e práticos disponíveis na literatura e utilizados no decorrer desse trabalho, assim como os problemas relacionados a contaminação alimentar com o emprego de herbicidas nas lavouras de milho. O capítulo apresenta um breve histórico sobre as técnicas miniaturizadas empregadas (MEPS e BAμE).

O capítulo 2 se refere a síntese dos polímeros molecularmente impressos e sua caracterização utilizando a microscopia eletrônica de varredura e a espectroscopia eletrônica na região do infravermelho. A seletividade dos materiais impressos também foi avaliada, bem como as constantes de seletividade entre MIP e NIP.

O capítulo 3 aborda a otimização e validação de dois métodos MEPS para extração de triazinas e sulfoniluréias em milho. MEPS, tem se destacado por proporcionar eficiente extração, utilizando um pequeno volume de amostra, sorvente e solvente. Os métodos foram otimizados, empregando modelos quimiométricos, tais como, planejamento fatorial e composto central e em seguida validados e aplicados em amostras de milho.

O capítulo 4 também destaca a importância de um novo método de preparo de amostra, por flutuação. A microextração por barra de agitação é uma miniaturização da extração sortiva em barra, que surgiu a fim de minimizar algumas limitações da SBSE. A BAμE é uma técnica estática por meio de flutuação, no qual ocorre a sorção entre a fase sólida e os analitos presentes

em solução. O método foi otimizado de forma univariado, validado e aplicado em amostras de milho.

Por fim, o capítulo 5 apresenta a conclusão geral sobre o trabalho.

Capítulo 1

Revisão Bibliográfica

Introdução

1.1 Milho

O Brasil ocupa posição de destaque no cenário do agronegócio mundial, figurando entre os maiores exportadores mundiais de alimentos oriundos de diversas culturas como café, açúcar, suco de laranja, soja e milho. Segundo o IBGE, em 2014, a produção da safra nacional de grãos alcançou cerca de 195 milhões de toneladas, sendo que as três principais culturas (milho, arroz e soja) representam 92,4% da produção de grãos (1). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, totalizando 79,0 milhões de toneladas na safra 2015/2016, ficando atrás somente dos Estados Unidos e China (2).

A importância econômica dos cereais é caracterizada pelas diversas formas de sua utilização, que vai desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia. O milho é o melhor exemplo de uso na alimentação animal, pois cerca de 70% do mesmo é utilizado para este fim. É neste contexto que o avanço da agricultura moderna, juntamente com a modernização dos meios de produção e ampliação das fronteiras, principalmente, a grande demanda por produtos em quantidades e qualidades, tem exigido o uso de agrotóxicos para a garantia de sua produtividade (3).

1.2 Agrotóxicos

A partir da década de 90, poucos países cresceram tanto no comércio internacional do agronegócio como o Brasil, o qual se tornou um dos líderes mundiais na produção e exportação de diversos produtos agropecuários. No início de 2010 em cada quatro produtos do agronegócio em circulação no mundo, um era brasileiro. A projeção do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é que, até 2030, um terço dos produtos comercializados seja do Brasil, em função da crescente demanda dos países asiáticos (3).

A fim de conseguir atender a grande demanda, o uso de herbicidas, tem se tornado obrigatório na agricultura, o que tem levado a sérias preocupações ambientais, devido ao seu uso de maneira inadequada e a sua toxicidade em seres humanos e organismos no ecossistema.

Os termos defensivos agrícolas, praguicidas, agrotóxicos, herbicidas, pesticidas, desinfetantes, biocidas ou agroquímicos são denominações usadas com o mesmo significado, embora possam acontecer algumas definições mais restritas ao excluir ou incluir diferentes grupos de substâncias químicas (3).

1.2.1 Triazinas

As triazinas foram descobertas em 1954 e desde então tornaram-se populares no mundo (5). Elas são aplicadas na agricultura para o controle de plantas daninhas pré e pós-emergente (6). O aumento da produção e aplicação de triazinas para fins agrícolas tem levado sérias preocupações ambientais e a saúde humana (4). Devido a sua baixa adsorção no solo e alta solubilidade em água, estes compostos podem migrar do solo para a água, através do seu ciclo, podendo alcançar a água do mar e afetar a biota marinha, tendo os sistemas costeiros pequena capacidade de degradar estes compostos (assim como águas superficiais e subterrâneas), aumentando os riscos para saúde humana (7).

Os resíduos de triazinas e seus produtos de degradação podem causar sérios riscos à saúde humana, incluindo ação carcinogênica, cardiovascular, endócrina e defeitos de nascença (8,9). Portanto, o monitoramento de resíduos de herbicidas em produtos agrícolas é essencial para garantir a segurança alimentar e comércio internacional(10). Para a maioria dos produtos agrícolas, a Agência de Proteção Ambiental estabelecendo tolerância de herbicidas triazínicos $0,25 \text{ mg kg}^{-1}$. A União Europeia (EU) determina que os limites máximos de resíduos de atrazina e simazina no setor dos cereais foram $0,01$ e $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$, (8), respectivamente. Já a Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA), determina que os limites máximos de resíduos para esses compostos em milho seja entre $0,25$ e $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$. Na Figura 1, encontramos alguns compostos da classe das triazinas.

Figura 1 - Herbicidas da classe das triazinas

1.2.2 Sulfoniluréias

As sulfoniluréias são compostos de uma classe de herbicidas que controlam seletivamente uma variedade de plantas indesejáveis tais como as plantas daninhas, que interferem no crescimento de culturas e vegetais alimentares. Esses herbicidas tem sido desenvolvidos e comercializados em todo mundo para aplicação na maioria das colheitas, podendo ser empregadas no uso pré e pós-emergente (11). Elas foram descobertas e desenvolvida inicialmente pela Du Point a partir de 1975.

Baixas doses desses compostos são necessárias para o controlar ervas daninhas na agricultura, demonstrando que sob condições persistentes, (por exemplo, pH elevado do solo, baixas temperaturas, pouca chuva e fraca atividade microbiana), as baixas concentrações destes analitos ainda podem afetar o crescimento de plantas susceptíveis.

As sulfoniluréias, apresentam um avanço no controle de plantas daninhas, interferindo com uma enzima chave (ALS – acetolactato sintase) necessária para o crescimento de células de plantas daninhas (12). Seu modo seletivo e específico de ação são compatíveis com a tendência mundial de controle de plantas daninhas. Estes herbicidas podem ser degradados gerando subprodutos no meio ambiente, os quais podem ser mais tóxicos do que o composto

Figura 2: Herbicidas da classe das sulfoniluréias

inicial (11). A ANVISA estabelece como LMR para o metsulfuron, variando de 0,1 - 0,02 mg kg⁻¹ (13). A Figura 2, apresenta alguns compostos empregados da classe das sulfoniluréias como herbicidas.

Com isso, a quantificação e detecção dos baixos níveis de herbicidas, impostos pelas agências regulamentadoras, requerem o desenvolvimento de métodos analíticos que apresentem alta seletividade, sensibilidade, precisão e exatidão elevadas para a quantificação destes herbicidas. Sendo assim, torna-se importante o preparo das amostras, envolvendo as etapas de extração e pré-concentração, a fim de aumentar a sensibilidade e seletividade, possibilitando assim, alcançar os baixos limites de detecção e quantificação dos analitos.

1.3 Técnicas de preparo de amostra

A pré-concentração tem se tornando uma ferramenta importante para o desenvolvimento de métodos cromatográficos, visando alcançar limites de detecção/quantificação menores devido a concentração dos analitos e remoção de interferentes.

As etapas de separação/pré-concentração baseiam-se em diferentes processos. Como técnicas de extração tem-se a extração líquido-líquido convencional (LEE , do inglês, *Liquid*

Liquid Extraction) (14), extração em fase sólida (SPE, do inglês, *Solid Phase Extraction*) (15), dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês, *Matrix Solid Phase Dispersion*) (7), extração com fluido supercrítico (SFE, do inglês, *Supercritical Fluid Extraction*) (16), extração assistida por solvente (MAE, do inglês, *Microwave Assisted. Extraction*) (17), extração acelerada por solvente (ASE, do inglês, *Accelerated Solvent Extraction*) (18).

No entanto, tais técnicas apresentam como problemática principal o alto consumo de solventes orgânicos e elevados tempos de extração. Dentro deste contexto, vem crescendo a necessidade de se desenvolver/aprimorar técnicas de extração miniaturizadas, como a microextração em fase sólida (SPME, do inglês, *SolidPhase Microextraction*) (19), a extração microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês, *Dispersive liquid-liquid microextraction*) (20), a microextração adsortiva em barra (BA μ E, do inglês, *Bar Adsorptive Microextraction*) (21) e a microextração em dispositivos preenchidos com sorvente (MEPS, do inglês, *Microextraction by Packed Sorbent*) (22). Essas técnicas, quando hifenadas a sistemas analíticos de separação e detecção, têm resultado em análises rápidas, com baixo consumo de solvente, menor exposição dos analistas aos fluídos biológicos e aos solventes tóxicos, assim como maior precisão analítica e automação das análises. A seguir serão revisadas as técnicas de preparo de amostras empregadas neste trabalho.

1.3.1 Microextração adsortiva em barra

Recentemente, Nogueira propôs uma nova técnica da miniaturização da extração sor-tiva com barras de agitação (SBSE, do inglês, *stir bar sorptive extraction*) (PMDS); o princípio da técnica baseia-se no equilíbrio de partição (absorção) dos analitos entre a amostra e fase extratora, assim como na extração líquido-líquido e na SPME, a qual apresenta limitações nas análises de compostos orgânicos com características mais polares (23). Nesse sentido, a BA μ E surge como forma de auxiliar as dificuldades no enriquecimento dos analitos polares, tendo apresentado grande potencial, mostrando ser uma boa alternativa a outras técnicas de microextração estática (24).

Essa nova metodologia analítica opera através da inovadora tecnologia de amostragem por flutuação. A BA μ E, possibilita empregar diversos materiais como sorventes, os quais devem apresentar elevada capacidade adsortiva e interação com analito em estudo (25). Alguns poucos adsorventes já foram utilizados, como os carvões ativos e polímeros como DVB

(21,26,27,28); o emprego de outros sorventes é de fundamental importância, principalmente combinada com a síntese de materiais pode tornar-se uma técnica promissora.

Na BAμE, o sorvente é constituído por um sólido fino (1-5 mg) aproximadamente, fixado com adesivo convenientemente aos suportes (7,5 mm em comprimento e 3 mm de largura) à base de polipropileno apresentando geometria com formato cilíndrico. Essa nova abordagem apresenta a grande vantagem do dispositivo analítico flutuar através da agitação gerada por uma barra de agitação convencional em teflon, como é representado na Figura 3, evitando assim a desagregação mecânica das partículas do sorvente e aumentando o tempo médio de vida (29).

Após a etapa de extração, as barras são removidas e submetidas ao processo de dessorção, empregado dessorção líquida (LD). As barras são inseridas em *inserts* e devem ser totalmente imersas no solvente escolhido sob tratamento ultrassônico, podendo ser hifenada com qualquer sistema de separação, incluindo a cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e eletroforese capilar (EC) combinadas com a espectrometria de massas e outros detectores (23).

Figura 3 - Representação esquemática exemplificando os modos de operação da microextração por flutuação (a) Dessorção por DL (b) usados na técnica BAμE . 1 - Frasco de amostragem; 2 - Vortex; 3 - Amostra; 4 - Barra de agitação magnética em Teflon; 5 – Dispositivo de BAμE; 6- Vial; 7 – solvente DL

Fonte: NOGUEIRA, J. M. F. Stir-bar sorptive extraction – 15 years making sample preparation more environment friendly. TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 71, p. 214-223, 2015.

1.3.2 Microextração em Dispositivos Preenchidos com Sorvente

A MEPS é uma miniaturização da extração em fase sólida, introduzida por Abdel-Rehim (30), sendo um avanço no campo de preparo da amostra com a mesma funcionalidade da SPE (31). MEPS é uma técnica simples, rápida, com baixo consumo de amostra e solventes, permitindo a remoção de interferentes, isolamento e concentração dos analitos (32). Pode ser utilizada no modo *off-line* ou *on-line* conectado a um amostrador automático a cromatografia líquida ou gasosa (32). Essas características se devem à junção de dois elementos essenciais nessa técnica, a preparação das amostras e a miniaturização.

O emprego da técnica MEPS tem sido utilizada para extrair uma diversidade de fármacos, herbicidas, metabolitos e peptídeos em diferentes matrizes, tais como, urina, plasma, sangue, alimentos, águas residuais, etc (33,34,35,36,37,38,39). Na MEPS cerca de 1-4 mg do sorvente é inserido entre a agulha e a seringa, compartimento denominado de BIN (do inglês, *Barrel Insert and Needle*) conforme ilustrado na Figura 4. Os materiais mais utilizados como sorventes são as sílicas (C2, C8, C18), sílicas modificadas, material de acesso restrito, poliestireno de divinilbenzeno e os de troca iônica (40).

No processo de extração utilizando MEPS, primeiramente é feito o condicionamento do sorvente. Utiliza-se um solvente apropriado, ocorrendo assim à ativação da fase extratora. Em seguida, a amostra é aspirada pela seringa, quando ocorre à percolação desta através da fase extratora, etapa a qual pode ser realizada em um ou mais ciclos, de acordo com a característica da amostra. Para a remoção dos interferentes contidos na amostra realiza-se a etapa de *clean-up* do BIN, utilizando um solvente que não apresente afinidade com o analito. Por fim, os analitos são eluídos com o solvente apropriado, o esquema do processo é demonstrado na Figura 5.

A seringa de MEPS utilizada nesse trabalho foi confeccionada pela Oficina Mecânica do IQSC, onde o protótipo foi elaborado tendo como base a seringa comercialmente desenvolvida pela SGE Analytical Science, com inovações (41).

Figura 4 - Representação esquemática da seringa de MEPS

Fonte: ABDEL-REHIM, M. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. Journal of Chromatography A, v. 1217, n. 16, p. 2569-80, 2010.

Figura 5 - Esquema das etapas de extração empregadas em MEPS

Vale ressaltar que uma limitação das técnicas de preparo de amostra é a disponibilidade de sorventes empregados como fase sólida nesses processos, apresentando boas recuperações mas não permitindo uma eliminação de interferentes e *clean-up* das amostras. Com isso, é grande a busca por novos sorventes que apresentem alta seletividade, principalmente, no desenvolvimento de novas metodologias analíticas (42). Recentemente, a ciência de materiais,

tem desenvolvido diversos tipos de novos sorventes, afim de maximizar essa limitação, tais como, sílica funcionalizada (43), nanotubos de carbono (44), materiais a base de grafeno (45), líquidos iônicos (46).

Todavia, a busca por materiais com elevada especificidade tem se tornando essencial nos dias atuais, nesse contexto, merecem destaque os polímeros molecularmente impressos.

1.4 Polímeros Molecularmente Impressos

O conceito de impressão molecular é muito antigo, porém, sua aplicação em diversos campos está em constante desenvolvimento, principalmente a partir da década de 1990. Os primeiros exemplos de impressão molecular pelo uso de polímeros orgânicos sintéticos foram relatados por Kiefer et al. e Wulff e Sarhan em 1972 e a partir de então foi possível observar um aumento no número de publicações referentes ao emprego desses materiais (42).

O princípio da impressão molecular, leva em consideração a importância na escolha criteriosa de componentes, tais como, molécula molde, monômero, agente de ligação cruzada, iniciador radicalar e o solvente porogênico, pois a combinação deles, influenciara na sua seletividade (47). Na Figura 6 são apresentados os reagentes principais empregados durante a síntese dos materiais impressos.

É imprescindível observar as prováveis interações que acontecem entre a molécula molde e do monômero. A interação estabelecida entre o molde e o monômero funcional determina qual o método de impressão molecular será empregado, podendo ser covalente, não covalente ou semi-covalente (47). Na Tabela 1, é possível observar alguns monômeros empregados na síntese de MIPs.

As ligações covalentes, entre o monômero funcional e a molécula molde são reversíveis e a forte interação obtida através desses compostos é a principal característica desse processo de síntese. Entretanto, para a remoção da molécula molde, ocorre a clivagem das ligações correspondentes, sendo as vezes necessário o emprego de hidrólise a fim de facilitar o processo de eluição dos analitos (42).

Figura 6 - Esquema da síntese dos polímeros impressos. a) monômeros funcionais, b) agente de ligação cruzada, c) Analito (molde); 1) os monômeros funcionais são complexados a molécula molde. 2) Co-polimerização entre os monômeros funcionais e o agente de ligação cruzada. 3) Após a polimerização ocorre a formação da rede polimérica em torno do molde. 4) Remoção do molde, deixando o polímero com as cavidades seletivas.

Tabela 1 - Monômeros tipicamente usados no preparo dos MIP.

Monômero funcional	Nome do monômero	Tipos de ligações
	Acrilamida	Ligação de hidrogênio
	Ácido acrílico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
	Ácido metacrílico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
	Ácido p-vinilbenzóico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
	4-Vinilpiridina	Interação iônica, ligação de hidrogênio e transferência de carga
	2-Vinilpiridina	Interação iônica, ligação de hidrogênio e transferência de carga
	1-Vinilimidazol	Interação iônica, ligação de hidrogênio e coordenação com metais
	4-Vinilimidazol	Interação iônica, ligação de hidrogênio e coordenação com metais

Polímeros impressos preparados por meio de interações não-covalentes entre o monômero e analito, tais como, dipolo-dipolo, ligação de hidrogênio e eletrostáticas, são majoritariamente utilizados, tendo sido empregada amplamente no preparo de amostra, e apresentando como vantagens a sua fácil preparação e eluição dos analitos. Já as semi-covalentes ocorrem através de um híbrido de algum dos dois primeiros métodos sendo formadas inicialmente ligações covalentes (garantindo maior seletividade) e as ligações não covalentes (que facilitam o processo de eluição) (48).

Os reagentes de ligação cruzada, Figura 7, tem como finalidade possibilitar que os sítios de ligação adquiram uma estrutura rígida, gerando uma matriz polimérica rígida, e mantendo os grupos funcionais fixos nas cavidades seletivas do material (48).

Figura 7 - Exemplos de reagentes de ligação cruzada utilizados na impressão molecular.
1) p- divinilbenzeno (DVB), 2) 1,3-diisopropenil benzeno (DIP), 3) etileno glicol dimetacrilato (EGDMA), 4) N,O-bisacrilóil-L-fenilalaninol, 5) 1,4 fenileno-diacrilamida, 6) N,N -fenilendiácrlamida

O iniciador radicalar é o responsável pelo início da polimerização, podendo ocorrer por um processo termoquímico e/ou fotoquímico. A escolha do solvente empregado durante a síntese do polímero desempenha um papel importante na estabilidade entre as interações, promovendo a solubilização do meio, não interferindo na interação analito-monômero, sendo responsável pelas interações entre os analitos e os sítios de ligação, além de, influenciar as características morfológicas que o material irá apresentar (47) (Figura 8).

Os materiais impressos demonstram diversas vantagens, tais como uma elevada seletividade, especificidade para a molécula molde empregada no processo de síntese, baixo custo, estabilidade térmica, capacidade de reutilização e robustez, além de possibilitarem seu uso com a variação do pH (42). Entretanto, uma limitação é o reconhecimento molecular em meio aquoso; afim de contornar esse problema, diferentes estratégias de sínteses, estão disponíveis, sua escolha ocorrendo de acordo com a necessidade. As principais metodologias propostas são polimerização em “*bulk*” (49), sol-gel (50), precipitação (51) e suspensão (52).

MIPs têm apresentando, durante todo esse tempo, muitas aplicações em diversas áreas e também sendo empregado em diversas técnicas de preparo de amostras, como é demonstrado na Tabela 2.

Figura 8 - Exemplos de iniciadores radicalares empregados na impressão molecular: 1) 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN); 2) azo-bis-dimetilvaleronitrila (ABDV); 3) dimetilacetal de benzila; 4) peróxido de benzoíla (BPO) e 5) ácido 4,4'-azo-bis (4-ciano pentaenóico).

Tabela 2 - Exemplos do emprego de MIP em diversas técnicas de preparo da amostra.

Molécula molde	Amostras	Método	Ref.
Berberina	Plasma e urina	μ SPE-HPLC/UV	(53)
Diazinon	Pepino e amostras de água	SPE-HPLC/UV	(54)
Epinefrina	Plasma e urina	SPME-CE/UV	(55)
Ractopamina	Carne de porco, fígado e rações	SBSE-HPLC	(56)
Oxitetraciclina	Águas	SPE-HPLC	(57)
Fenthion	Azeite	SPE-HPLC/UV	(58)
Melamina	Leite em pó	SBSE-HPLC	(59)
Ciprofloxacino	Águas	HPLC-MEPS-MS/MS	(60)

REFERÊNCIAS

- 1 IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística)**. Disponível em: <<
<http://www.ibge.gov.br/home/>>>. Acesso em: 7 ago. 2015.
- 2 **Safra Mundial de Milho - FIESP**. Disponível em: <<http://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-milho-2/>>. Acesso em: 28 set. 2015.
- 3 **Milho - MAPA**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho>>. Acesso em: 28 set. 2015.
- 4 RAKHSHAN, N.; PAKIZEH, M. Removal of triazines from water using a novel OA modified SiO₂/PA/PSf nanocomposite membrane. **Separation and Purification Technology**, v. 147, p. 245–256, 2015.
- 5 LIU, T. et al. Determination of triazine herbicides in milk by cloud point extraction and high-performance liquid chromatography. **Food chemistry**, v. 142, p. 358–64, 2014.

- 6 WANG, Y. et al. Determination of triazines in honey by dispersive liquid-liquid microextraction high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography. A**, v. 1217, n. 26, p. 4241–6, 2010.
- 7 RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, N. et al. Development of a Matrix Solid Phase Dispersion methodology for the determination of triazine herbicides in mussels. **Food chemistry**, v. 173, p. 391–6, 2015.
- 8 ZHAO, Q. et al. Determination triazine pesticides in cereal samples based on single-hole hollow molecularly imprinted microspheres. **Journal of chromatography. A**, v. 1376, p. 26–34, 2015.
- 9 MAO, B. et al. Determination of triazine residues in herbal plants using molecularly imprinted polymer extraction followed by UPLC-MS/MS. **Analytical Methods**, v. 5, n. 14, p. 3582, 2013.
- 10 TIAN, M. et al. Preparation and evaluation of ionic liquid-calixarene solid-phase microextraction fibres for the determination of triazines in fruit and vegetable samples. **Food chemistry**, v. 145, p. 28–33, 2014.
- 11 TANG, K. et al. Preparation of molecularly imprinted polymer for use as SPE adsorbent for the simultaneous determination of five sulphonylurea herbicides by HPLC. **Food chemistry**, v. 150, p. 106–12, 2014.
- 12 CAN, A.; YILDIZ, I.; GUVENDIK, G. The determination of toxicities of sulphonylurea and phenylurea herbicides with quantitative structure-toxicity relationship (QSTR) studies. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 35, n. 3, p. 369–79, 2013.
- 13 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c39dcd004bda62d38190d9bc0f9d5b29/Consulta+P%C3%BAblica+n%C2%B0+44+GGTOX.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 19 ago. 2015.
- 14 GARCÍA-MORALEJA, A. et al. Development of a new method for the simultaneous determination of 21 mycotoxins in coffee beverages by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Research International**, v. 72, p. 247–255, 2015.
- 15 TARLEY, C. R. T. et al. Synthesis and application of imprinted polyvinylimidazole-silica hybrid copolymer for Pb²⁺ determination by flow-injection thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 703, n. 2, p. 145–51, 2011.
- 16 FRANCO, M. S. et al. SPME determination of low concentration levels of monoaromatic chemical markers in soils after remediation by supercritical fluid extraction. **Anal. Methods**, v. 7, n. 12, p. 4901–4907, 2015.
- 17 SHAH, J. et al. Quantification of triazine herbicides in soil by microwave-assisted extraction and high-performance liquid chromatography. **Environmental monitoring and assessment**, v. 178, n. 1–4, p. 111–9, 2011.

- 18 CHUANG, Y.-H. et al. Comparison of accelerated solvent extraction and quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction and determination of pharmaceuticals in vegetables. **Journal of chromatography. A**, v. 1404, p. 1–9, 2015.
- 19 LIMA GOMES, P. C. F. et al. Determination of steroids, caffeine and methylparaben in water using solid phase microextraction-comprehensive two dimensional gas chromatography-time of flight mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1299, p. 126–30, 2013.
- 20 MOREIRA, B. J.; YOKOYA, J. M. C.; GAITANI, C. M. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos, inovações e aplicações biológicas. *Scientia Chromatographica*, v.6, n.3, p.186-204, 2014.
- 21 ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J. M. F. Determination of trace levels of parabens in real matrices by bar adsorptive microextraction using selective sorbent phases. **Journal of chromatography. A**, v. 1348, p. 17–26, 2014.
- 22 ANDRADE, F. N.; SANTOS-NETO, Á. J.; LANÇAS, F. M. Microextraction by packed sorbent liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry of triazines employing a molecularly imprinted polymer. **Journal of separation science**, v. 37, n. 21, p. 3150–6, 2014.
- 23 NOGUEIRA, J. M. F. Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques. **Analytica chimica acta**, v. 757, p. 1–10, 2012.
- 24 NOGUEIRA, J. M. F. Stir-bar sorptive extraction – 15 years making sample preparation more environment friendly. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 214-223, 2015.
- 25 ALMEIDA, C.; STRZELCZYK, R.; NOGUEIRA, J. M. F. Improvements on bar adsorptive microextraction (BA μ E) technique--application for the determination of insecticide repellents in environmental water matrices. **Talanta**, v. 120, p. 126–34, 2014.
- 26 NENG, N. R.; NOGUEIRA, J. M. F. Determination of short-chain carbonyl compounds in drinking water matrices by bar adsorptive micro-extraction (BA μ E) with in situ derivatization. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, p. 3155-3163, 2010.
- 27 ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J. M. F. Determination of steroid sex hormones in real matrices by bar adsorptive microextraction (BA μ E). **Talanta**, v. 136, p. 145–54, 2015.
- 28 AHMAD, S. M. et al. Application of bar adsorptive microextraction (BA μ E) for anti-doping control screening of anabolic steroids in urine matrices. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 969, p. 35–41, 2014.
- 29 NOGUEIRA, J. M. F. Microextração adsorptiva em barra (BA μ E): Um conceito analítico inovador para microextração estática. *Scientia Chromatographica*, v. 5, n.4, p.275-283, 2013.
- 30 ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbent (MEPS): a tutorial. **Analytica chimica acta**, v. 701, n. 2, p. 119–28, 2011.

- 31 ABDEL-REHIM, M.; ALTUN, Z.; BLOMBERG, L. Microextraction in packed syringe (MEPS) for liquid and gas chromatographic applications. Part II--Determination of ropivacaine and its metabolites in human plasma samples using MEPS with liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of mass spectrometry : JMS**, v. 39, n. 12, p. 1488–93, 2004.
- 32 DARYANAVARD, S. M. et al. Molecularly imprinted polymer in microextraction by packed sorbent for the simultaneous determination of local anesthetics: lidocaine, ropivacaine, mepivacaine and bupivacaine in plasma and urine samples. **Biomedical chromatography : BMC**, v. 27, n. 11, p. 1481–8, 2013.
- 33 SAID, R. et al. Determination of remifentanyl in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry utilizing micro extraction in packed syringe (MEPS) as sample preparation. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 879, n. 11-12, p. 815–8, 2011.
- 34 DU, W. et al. Determination of clenbuterol from pork samples using surface molecularly imprinted polymers as the selective sorbents for microextraction in packed syringe. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 91, p. 160–8, 2014.
- 35 SAID, R. et al. Microextraction by packed sorbent for LC-MS/MS determination of drugs in whole blood samples. **Bioanalysis**, v. 2, n. 2, p. 197–205, 2010.
- 36 NIELSEN, K. et al. Rapid screening of drug compounds in urine using a combination of microextraction by packed sorbent and rotating micropillar array electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 26, n. 3, p. 297–303, 2012.
- 37 SALAMI, F. H.; QUEIROZ, M. E. C. Microextraction in packed sorbent for analysis of sulfonamides in poultry litter wastewater samples by liquid chromatography and spectrophotometric detection. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 37, n. 16, p. 2377–2388, 2014.
- 38 CRISTINA JARDIM, V. et al. Determination of parabens in urine samples by microextraction using packed sorbent and ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 974, p. 35–41, 2015.
- 39 SALAMI, F. H.; QUEIROZ, M. E. C. 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, n. 10, p. 899–904, 2013.
- 40 ABDEL-REHIM, M. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. **Journal of chromatography. A**, v. 1217, n. 16, p. 2569–80, 2010.
- 41 SANTOS-NETO, A. J. et al. **Microdispositivo de extração desmontável para adaptação a microsseringas de agulha removível**. BR n. PI 1020130254517, 09 nov. 2014.
- 42 FUMES, B. H. et al. Recent advances and future trends in new materials in sample preparation. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 9–25, 2015.

- 43 BORDOLOI, A. et al. Inorganic–organic hybrid materials based on functionalized silica and carbon: A comprehensive understanding toward the structural property and catalytic activity difference over mesoporous silica and carbon supports. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 115, n. 3, p. 345–355, 2008.
- 44 ZHANG, B.-T. et al. Application of carbon-based nanomaterials in sample preparation: a review. **Analytica chimica acta**, v. 784, p. 1–17, 2013.
- 45 SIERRA, U. et al. New alternatives to graphite for producing graphene materials. **Carbon**, v. 93, p. 812–818, 2015.
- 46 LI, Y. et al. Novel multi-responsive polymer materials: When ionic liquids step in. **European Polymer Journal**, v. 69, p. 441–448, 2015.
- 47 SANTOS, M. G. et al. Emprego de polímeros de impressão molecular em preparo de amostras para análise de compostos orgânicos: aplicações e tendências. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 161–195, 2012.
- 48 MARESTONI, L. D. et al. Polímeros impressos com íons: fundamentos, estratégias de preparo e aplicações em química analítica. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1194–1207, 2013.
- 49 SHEKARCHI, M. et al. Selective extraction of lamivudine in human serum and urine using molecularly imprinted polymer technique. **Journal of chromatography B**, v. 931, p. 50–55, 2013.
- 50 GOMES COSTA SILVA, R. et al. Molecularly imprinted silica as a selective SPE sorbent for triazine herbicides. **Journal of separation science**, v. 33, n. 9, p. 1319–1324, 2010.
- 51 XU, S.; LI, J.; CHEN, L. Molecularly imprinted polymers by reversible addition-fragmentation chain transfer precipitation polymerization for preconcentration of atrazine in food matrices. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 282–289, 2011.
- 52 WALSH, R. et al. Synthesis of imprinted beads by aqueous suspension polymerisation for chiral recognition of antihistamines. **Journal of chromatography B**, v. 879, n. 30, p. 3523–3530, 2011.
- 53 ZHANG, W.; CHEN, Z. Preparation of micropipette tip-based molecularly imprinted monolith for selective micro-solid phase extraction of berberine in plasma and urine samples. **Talanta**, v. 103, p. 103–9, 2013.
- 54 DAVOODI, D. et al. Preparation, evaluation and application of diazinon imprinted polymers as the sorbent in molecularly imprinted solid-phase extraction and liquid chromatography analysis in cucumber and aqueous samples. **Food chemistry**, v. 158, p. 421–8, 2014.
- 55 ZHANG, X. et al. Molecularly imprinted solid phase microextraction fiber for trace analysis of catecholamines in urine and serum samples by capillary electrophoresis. **Talanta**, v. 99, p. 270–6, 2012.

56 XU, Z. et al. Investigation of ractopamine molecularly imprinted stir bar sorptive extraction and its application for trace analysis of beta2-agonists in complex samples. **Journal of chromatography. A**, v. 1217, n. 22, p. 3612–8, 2010.

57 ABRÃO, L. C. C.; MAIA, P. P.; FIGUEIREDO, E. C. Determination of Tetracyclines by Solid-Phase Extraction with a Molecularly Imprinted Polymer and High-Performance Liquid Chromatography. **Analytical Letters**, v. 47, n. 13, p. 2183–2194, 2014.

58 BAKAS, I. et al. Molecularly imprinted polymer cartridges coupled to high performance liquid chromatography (HPLC-UV) for simple and rapid analysis of fenthion in olive oil. **Talanta**, v. 125, p. 313–8, 2014.

59 ZHU, L. et al. Determination of melamine in powdered milk by molecularly imprinted stir bar sorptive extraction coupled with HPLC. **Journal of colloid and interface science**, v. 454, p. 8–13, 2015.

60 PRIETO, A. et al. Synthesis of a molecularly imprinted polymer and its application for microextraction by packed sorbent for the determination of fluoroquinolone related compounds in water. **Analytica chimica acta**, v. 685, n. 2, p. 146–52, 2011.

Capítulo 2

Síntese, caracterização e seletividade dos MIPs

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

Sintetizar e caracterizar dois polímeros molecularmente impressos, para duas classes de herbicidas distintas (triazinas e sulfonilúreias), variando a molécula molde, empregando a atrazina e o bensulfuron.

1.2 Específicos

- (1) Síntese dos MIPs para as classes das triazinas e sulfonilúreias;
- (2) Caracterização dos materiais sintetizados através da espectroscopia no infravermelho e da microscopia eletrônica de varredura;
- (3) Avaliação da seletividade dos polímeros sintetizados;
- (4) Comparação dos MIP com o NIP e sorventes comercialmente disponíveis.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Padrões e reagentes

Os reagentes para a síntese dos polímeros, ácido metacrílico, etileno glicol dimetacrilato, 2 – azoisobisbutonitrila e padrões analíticos de atrazina, ametrina, simetrina, simazina, terbutrina, bensulfuron, clorosulfuron, tribenuron e thifensulfuron foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Ácido acético glacial (Mallinckrodt, Xalostoc, México) e metanol grau HPLC, da Tedia (Fairfield, EUA) foram utilizados no trabalho. A água deionizada foi fornecida por um sistema Milli-Q da Millipore (Bedford, EUA).

2.2 Síntese e caracterização do MIP e NIP

A síntese do material impresso, foi realizada seguindo o conceito da polimerização por precipitação (5). Cerca de 0,5 mmol da molécula molde e 2,0 mmol de ácido metacrílico foram solubilizados em 30 mL de acetonitrila, sendo essa mistura estocada por 12 horas numa temperatura de 4°C. Posteriormente, 10 mmol de etileno glicol dimetacrilato e 0,12 mmol de 2- azoisobisbutonitrila foram adicionados à mistura, ficando durante 10 minutos sob atmosfera de nitrogênio, em seguida o frasco foi selado e a mistura ficou em agitação magnética por 24 horas à 60°C. Após a síntese, as moléculas moldes, as quais foram retidos na cavidade seletiva do polímero, foram removidas após sucessivas lavagens com uma mistura de metanol:ácido acético (9:1), e seco a 60°C. A Figura 9 demonstra o esquema de síntese para a classe das triazinas, empregando como molécula molde, a atrazina. Enquanto a Figura 10, representa a síntese para a classe das sulfonilúreias, empregando o bensulfuron, como molécula molde. Com finalidade de avaliar a influência da impressão molecular realizada durante as sínteses, preparou-se um novo polímero mas sem adição da molécula molde, chamado de NIP.

Figura 9 - Esquema de síntese para obtenção do polímero para a classe das triazinas.

Figura 10 - Esquema de síntese para obtenção do polímero para a classe das sulfoniluréias.

2.3 Caracterização dos MIPs

Para a caracterização dos polímeros sintetizados foram utilizadas as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Zeiss-Leica/440) operando a 20 kV e as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro. Os espectros vibracionais na região do infravermelho (FT-IR) foram obtidos de 4000 a 400 cm^{-1} no equipamento Bomem MB-102 empregando disco de KBr para preparar as amostras.

2.4 Avaliação do efeito de impressão no MIP

Para avaliar o efeito de impressão no MIP, ou seja, a seletividade para as moléculas das triazinas e sulfoniluréias, foram realizados estudos de adsorção em

soluções binárias de atrazina/propanil, atrazina/picloram, bensulfuron/betazon e bensulfuron/prometon tanto para o MIP e NIP, sintetizados para ambas as classes. Os compostos concomitantes propanil, picloram, betazon e prometon foram escolhidos neste estudo por serem herbicidas amplamente empregados no campo.

Estes experimentos foram realizados à temperatura ambiente, adicionando-se 50 mg do polímero a um frasco de polietileno, seguido de agitação durante 15 minutos com 20 mL de uma solução binária contendo 1 mg L^{-1} de cada composto (1). Após esta etapa, o sobrenadante foi coletado e determinado por LC-UV. Com base nestes experimentos, foram determinados os parâmetros relacionados ao desempenho da seletividade do adsorvente, tais como coeficiente de distribuição (K_d), coeficiente de seletividade (k) e coeficiente de seletividade relativo (k') (2,3). O coeficiente de distribuição das triazinas e sulfoniluréias e concomitantes foi calculado a partir da equação (1):

$$K_d = \left[\frac{(C_i - C_f)}{C_f} \right] \times \frac{V(\text{mL})}{\text{massa of MIP(g)}} \quad (1)$$

onde C_i , C_f e V representam a concentração inicial, final e o volume da solução, respectivamente. O coeficiente de seletividade é definido como a relação entre o coeficiente de distribuição para as moléculas moldes e o coeficiente de distribuição para as moléculas interferentes.

Para fazer a comparação dos valores de k entre o polímero impresso e o polímero controle, ou seja, o coeficiente de seletividade relativo (k'), a equação 2 foi empregada. Esta equação permite uma estimativa do efeito da impressão na seletividade (4).

$$k' = \frac{k_{\text{impresso}}}{k_{\text{sem impressão}}} \quad (2)$$

RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Espectros vibracionais na região do infravermelho

Os espectros de infravermelho dos polímeros MIP e NIP, para ambas as classes são apresentados na Figura 11. Podemos observar uma semelhança entre os espectros, como já era o esperado, visto que os reagentes empregados foram os mesmos, mudando

somente a molécula molde. Na região de $3588\text{-}3577\text{ cm}^{-1}$ observa-se uma banda de deformação axial referente à presença da hidroxila (OH); as vibrações em $2995\text{ - }2956\text{ cm}^{-1}$ correspondem, respectivamente, aos estiramentos das ligações C-H. Em $1720\text{-}1735\text{ cm}^{-1}$, podemos observar, a banda da carboxila livre estando associado com o grupo funcional do ácido metacrilato. Já as bandas em $1265\text{-}1262\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas aos estiramentos C-O, sugerindo assim a obtenção dos materiais sintetizados (6). Na Tabela 3, é possível observar os principais comprimentos de onda, sugerindo a obtenção do polímero proposto.

Figura 11 - Espectro de infravermelho para os polímeros MIP e NIP; (A) triazinas e (B) sulfoniluréias.

Tabela 3 - Principais comprimentos de onda observados para os MIPs.

Grupo funcional	Número de onda (cm^{-1})	
	MIP Triazinas	MIP Sulfoniluréias
O-H	3577	3588
C-H	2995 e 2947	2990 e 2956
C=O	1720	1735
C-O	1265	1262

3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias exibidas na Figura 12, demonstram algumas diferenças nas morfologias dos polímeros. Pode-se observar claramente diferenças entre as micrografias dos polímeros impressos, e alterações para os polímeros não impressos. Nos MIPs observa-se um maior volume de poros e alta rugosidade e partículas mais uniformes, o que é de extrema importância em estudos de sorção, facilitando a transferência entre a fase sólida e analito (7). Por outro lado, os NIPs, apresentam um menor grau de agregação entre suas partículas. Este comportamento sugere que a vantagem da presença da impressão molecular durante a síntese, ajuda a promover um melhor acessibilidade das moléculas em direção as cavidades seletivas do material sintetizado.

Figura 12 - Imagem da microscopia eletrônica de varredura do MIP (A e C) NIP (B e D), das triazinas e sulfoniluréias respectivamente, com ampliação de 5.000 vezes para (A e B) e de 10.000 vezes para (C e D).

3.4 Teste de Seletividade

O efeito de impressão foi avaliada comparando-se o comportamento de adsorção de moléculas de atrazina com o propanil e picloram, e de sulfonilúreias com o betazon e prometom, tanto para o MIP e NIP. A Tabela 4, mostra os valores obtidos para o coeficiente de distribuição (K_d), a seletividade (k), e seletividade relativa (k').

Tabela 4 - Parâmetros relacionados ao efeito de impressão (K_d , k , k').

Concentração Inicial (mg L ⁻¹)			K _d (mL g ⁻¹)		<i>k</i>	<i>k'</i>
	<i>Atrazina</i>	<i>Propanil</i>	<i>Atrazina</i>	<i>Propanil</i>	MIP/NIP	
MIP	1,0	1,0	192,0	22,2	8,6	17,2
NIP	1,0	1,0	50,0	96,6	0,50	
Concentração Inicial (mg L ⁻¹)			K _d (mL g ⁻¹)		<i>k</i>	<i>k'</i>
	<i>Atrazina</i>	<i>Picloram</i>	<i>Atrazina</i>	<i>Picloram</i>	MIP/NIP	
MIP	1,0	1,0	202,0	104,0	1,9	3,2
NIP	1,0	1,0	63,0	98,0	0,60	
Concentração Inicial (mg L ⁻¹)			K _d (mL g ⁻¹)		<i>k</i>	<i>k'</i>
	<i>Bensulfuron</i>	<i>Betazon</i>	<i>Bensulfuron</i>	<i>Betazon</i>	MIP/NIP	
MIP	1,0	1,0	381,0	53,1	7,1	10,6
NIP	1,0	1,0	84,0	124,7	0,67	
Concentração Inicial (mg L ⁻¹)			K _d (mL g ⁻¹)		<i>k</i>	<i>k'</i>
	<i>Bensulfuron</i>	<i>Prometon</i>	<i>Bensulfuron</i>	<i>Prometon</i>	MIP/NIP	
MIP	1,0	1,0	502,0	219,0	2,3	8,5
NIP	1,0	1,0	98,0	351,0	0,22	

O coeficiente de distribuição (K_d) indica a migração e afinidade do soluto selecionado para o material testado. Como pode ser observado, os valores de K_d são mais elevados para as moléculas moldes (atrazina e bensulfuron) no MIP se comparado ao NIP, sendo a uma indicação de que a síntese do polímero impresso foi bem sucedida. Além disso, a comparação com valores de K_d para os interferentes (propanil, picloram, betazon e prometon) reforça que a melhoria de afinidade de polímero era seletiva para o analito. Além disso, a comparação dos coeficientes de seletividade (k) obtidos para o MIP e NIP confirma a capacidade do material impresso de reconhecer a substância em concorrência com os interferentes testados.

É interessante observar que na ausência de um reconhecimento concebida quimicamente, a sorção inespecífica sobre o material NIP foi maior para as interferências, resultando em valores de $k < 1$. Finalmente, o coeficiente de seletividade relativa (k') é o valor calculado para avaliar a eficácia da impressão química do polímero, onde os valores $k' > 1$ confirmam um efeito positivo (8). A seguir são apresentando os valores obtidos de k' para as misturas atrazina/propanil (17,2), atrazina/picloram (3,2), bensulfuron/betazon (10,6) e bensulfuron/prometon (8,5) respectivamente, confirmando o efeito de impressão bem sucedida nos polímeros impressos. Para a validação, foram avaliados os rendimentos de recuperação para os compostos das triazinas e sulfoniluréias, mostrando resultados > 80% em condições otimizadas, como será observado nos próximos capítulos.

4 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram sintetizados dois polímeros molecularmente impressos visando seu uso para pré-concentração e *clean-up* para as classes de triazinas e sulfoniluréias, respectivamente, empregando ácido metacrílico como monômero funcional.

Com base nos coeficientes de seletividade relativa (k'), constatou-se que o MIP exibiu melhor seletividade para as triazinas e sulfoniluréias em relação as picloram, propanil, betazon e prometon. A caracterização dos sorventes por meio de espectroscopia na região do infravermelho e microscopia eletrônica de varredura foi útil para avaliar as características das morfológicas e estruturais entre os polímeros MIP e NIP.

REFERÊNCIAS

- 1 TARLEY, C. R. T. et al. Synthesis and application of imprinted polyvinylimidazole-silica hybrid copolymer for Pb²⁺ determination by flow-injection thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 703, n. 2, p. 145–51, 2011.
- 2 TARLEY, C. R. T. et al. Preparation of new ion-selective cross-linked poly(vinylimidazole-co-ethylene glycol dimethacrylate) using a double-imprinting process for the preconcentration of Pb²⁺ ions. **Journal of colloid and interface science**, v. 450, p. 254–63, 2015.
- 3 TARLEY, C. R. T. et al. Ion-imprinted polyvinylimidazole-silica hybrid copolymer for selective extraction of Pb(II): Characterization and metal adsorption kinetic and thermodynamic studies. **Reactive and Functional Polymers**, v. 72, n. 1, p. 83–91, 2012.
- 4 ANDRADE, F. N.; SANTOS-NETO, Á. J.; LANÇAS, F. M. Microextraction by packed sorbent liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry of triazines employing a molecularly imprinted polymer. **Journal of separation science**, v. 37, n. 21, p. 3150–6, 2014.
- 5 SANTOS, M. G. et al. Emprego de polímeros de impressão molecular em preparo de amostras para análise de compostos orgânicos: aplicações e tendências. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 161–195, 2012.
- 6 CLAUSEN, D. N.; PIRES, I. M. R.; TARLEY, C. R. T. Improved selective cholesterol adsorption by molecularly imprinted poly(methacrylic acid)/silica (PMAA-SiO₂) hybrid material synthesized with different molar ratios. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 44, p. 99–108, 2014.
- 7 SEGATELLI, M. G. et al. Cadmium ion-selective sorbent preconcentration method using ion imprinted poly(ethylene glycol dimethacrylate-co-vinylimidazole). **Reactive and Functional Polymers**, v. 70, n. 6, p. 325–333, 2010.
- 8 NACANO, L. R.; SEGATELLI, M. G.; TARLEY, C. R. T. Selective Sorbent Enrichment of Nickel Ions from Aqueous Solutions using a Hierarchically Hybrid Organic-Inorganic Polymer Based on Double Imprinting Concept. **J Braz. Chem. Soc.**, v. 21, n. 3, p. 419–430, 2010.

Capítulo 3

Microextração em Dispositivos Preenchidos com Sorvente - MEPS

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

O objetivo desse capítulo foi o uso da técnica MEPS empregando os MIPs como sorventes, a fim de estudar o seu desempenho na determinação de herbicidas das classes das triazinas e sulfoniluréias. O uso desse dispositivo na análise dos compostos de interesse, com aplicações em amostras de milho, foi avaliado, otimizado e validado, utilizando-se a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas para a etapa de separação e detecção dos analitos, respectivamente.

1.2 Específicos

- (1) Avaliar o emprego dos MIPs revestidos utilizando a técnica MEPS na etapa de preparo da amostras, com posterior análise cromatográfica;
- (2) Otimizar o processo de extração do dispositivo da MEPS a fim de obter melhores resultados durante o preparo das amostras;
- (3) Comparar o emprego do MIP e NIP com outros sorventes comercialmente disponíveis;
- (4) Validar e aplicar a(s) metodologia(s) desenvolvida(s) na determinação dos herbicidas em questão em amostras de milho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Padrões e Reagentes

No presente estudo padrões analíticos de cinco triazinas (ametrina, atrazina, simazina, simetrina e terbutrina), e quatro sulfoniluréias (bensulfuron, clorosulfuron, thifensulfuron e tribenuron), foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). As soluções estoques foram preparadas em acetonitrila em concentração de 1000 mg L⁻¹ e armazenadas a 4°C durante todo estudo.

Todos os reagentes utilizados apresentavam certificação analítica. O metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) com grau HPLC foram fornecidos pela Tédia (Fairfield, OH, USA). O ácido acético 99,7% foi adquirido pela Merck, (Darmstadt, Germany).

A água ultrapura foi obtida através de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, EUA).

2.2 Análises em LC-ESI-ToF

Para a separação analítica, utilizou-se um sistema HPLC série Prominence 20AD da Shimadzu, coluna cromatográfica NST C18 (2,1 mm x 150 mm x 5µm), volume de injeção de 5,0 µL, temperatura do forno 35°C, vazão 0,2 mL min⁻¹ e fase móvel composta de ACN e água na proporção 70:30 (v/v) para as triazinas e 40:60 (v/v) para as sulfoniluréias, ambas com 0,1% de ácido acético.

A detecção foi realizada por um espectrômetro de massas híbrido (QqTOF), Bruker, modelo MicrOTOF-Q II, funcionando no modo *full MS*. Esse sistema apresenta dois analisadores de massas em tandem, sendo um do tipo quadrupolo e o outro TOF (de alta resolução); o quadrupolo ficou em “*by pass*”, sendo o eluente da coluna de HPLC direcionado para o ESI em seguida para o ToF. A interface de eletrospray operou no modo positivo de ionização, voltagem do capilar de 3,5 kV, vazão do gás secante 8,0 L min⁻¹, pressão do nebulizador de 4,0 bar e temperatura da fonte de 200°C. As massas utilizadas para foram: simazina (202,085 ± 0,005), simetrina (214,109 ± 0,005), atrazina (216,099 ± 0,005), ametrina (228,128 ± 0,005), terbutrina (242,145 ± 0,005), tribenuron (396,100 ± 0,005), clorosulfuron (358,039 ± 0,005), thifensulfuron (388,041 ± 0,005) e bensulfuron (411,100 ± 0,005).

2.3 Preparação dos dispositivos para microextração – MEPS

As extrações foram realizadas utilizando um dispositivo de extração similar ao MEPS comercialmente disponível, o qual foi adaptado pelo nosso grupo de pesquisa (1).

A extração foi realizada utilizando uma seringa Hamilton (NEVADA, USA) com volume de 500 μ L, equipado com um cartucho de extração, denominado BIN, inserido entre a agulha e seringa, compreendendo cerca de 1,0 mg de MIP (2). A MEPS envolve quatro etapas de extração (condicionamento, amostragem, lavagem e eluição), as quais devem ser cuidadosamente otimizadas a fim de obter-se, uma melhor eficiência do processo de extração.

2.4 Otimização da eficiência da MEPS

Para a otimização do MEPS visando a análise das triazinas, foi empregado um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} associado com planejamento com composto central afim de obter-se os pontos ótimos de extração. Os fatores estudados para este trabalho foram o número de ciclos correspondente a cada etapa de extração, listados a seguir:

- ✓ Condicionamento
- ✓ Amostragem
- ✓ Lavagem
- ✓ Eluição

Para a otimização do MEPS visando a determinação de sulfoniluréias, foi utilizado um planejamento fatorial completo 2^3 . Os fatores avaliados para este trabalho foram:

- ✓ N° de ciclos de condicionamento
- ✓ N° de ciclos de amostragem
- ✓ Volume de eluição

O software Statistica 10.0 foi utilizado para a avaliação dos efeitos na construção do modelo, e este foi analisado por ANOVA (Análise de variância). Após este estudo as variáveis significativas foram otimizadas por um planejamento com composto central.

2.5 Validação do método

Para análises de resíduos de herbicidas devem ser desenvolvidos procedimentos eficientes de extração, bem como métodos analíticos com elevada seletividade, a fim de assegurar que, casos estes resíduos estejam presentes nas amostras analisadas, seja possível a sua separação e posterior quantificação (3).

A validação do método é um processo realizado a fim de demonstrar que é aceitável para a finalidade pretendida. É necessário levar em consideração todas as incertezas de um processo analítico, incluindo aquelas atribuídas ao analista, padrões, ambiente, calibrações e equipamentos (3,4). A validação faz parte da documentação submetida às agências governamentais de regulamentação da União Europeia, Estados Unidos e outros países, quando se almeja o registro de métodos usados para a quantificação de produtos como fármacos em fluidos biológicos e determinação de resíduos de herbicidas em diversas matrizes (5).

O emprego das técnicas cromatográficas na validação de um método pode ser considerado como a soma de diferentes etapas a serem incluídas em um processo analítico. Em geral, a validação envolve a execução e interpretação de uma série de experimentos planejados a fim de avaliar as características do método (4).

O protocolo de validação foi adaptado tendo como base critérios aceitos por diferentes diretrizes: a RE 899 da ANVISA (5) e União Européia (6, 7).

Os parâmetros avaliados na validação dos métodos foram: linearidade, precisão e exatidão intra e inter-dias, recuperação, limite de detecção e quantificação, reprodutibilidade intralaboratorial, efeito matriz e robustez (4,6).

A linearidade foi avaliada através das curvas analíticas construídas em quintuplicatas em seis níveis de concentração sendo totalizando um $n = 30$ para cada herbicida analisado. O limite de detecção (LD) foi estabelecido como sendo três vezes a amplitude do ruído da linha de base e o limite de quantificação (LQ) como sendo no mínimo dez vezes a amplitude do ruído da linha de base.

A precisão intra-dia foi avaliada em quintuplicata em três níveis diferentes (baixo, médio e alto para as triazinas e sulfonilúreias, em dois dias consecutivos e a precisão

inter-dias foi avaliada com os resultados dos dois dias de coleta dos dados. Os resultados destes ensaios foram expressos em desvio padrão relativos (DPR).

Similarmente ao ensaio de precisão, foi calculada a exatidão intra e inter-dias nos mesmos níveis e os resultados foram expressos em percentagem de desvio.

A reprodutibilidade intralaboratorial foi avaliada em três níveis diferentes (baixo, médio e alto) nas concentrações citadas acima. O primeiro conjunto de amostras fortificadas foi analisado nas condições padrões do método. O segundo conjunto foi analisado por outro analista e o terceiro conjunto alterando a temperatura da sala do equipamento.

O efeito matriz do método foi avaliado através da fortificação e recuperação dos herbicidas de acordo com o trabalho de Matuszewski e seus colaboradores (8).

A robustez foi avaliada através do teste de Youden, o qual avalia a influência de sete variáveis em dois níveis diferentes. As letras maiúsculas representam os valores nominais ou padrão do método desenvolvido e as letras minúsculas as variações a serem estudadas. Assim, neste teste são realizados oito experimentos de forma aleatória com a combinação fatorial dos parâmetros avaliados e verifica-se qual o efeito ou combinações de efeitos que influenciam no resultado final (Tabela 5).

Tabela 5 - Matriz de Youden

Efeito	Combinação dos parâmetros							
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
RESULTADO	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>

Em cada experimento foram realizadas duas injeções e os resultados da análise estão representados pelas letras de *s* a *z*.

Para comparar a influência da variação de cada parâmetro, deve-se calcular a diferença da média dos valores correspondentes às letras maiúsculas com a média dos valores referente às letras minúsculas como representado pelas equações 3.

$$Efeito \frac{A}{a} = D_a = \frac{s+t+u+v}{4} - \frac{w+x+y+z}{4} \quad (3)$$

$$Efeito \frac{B}{b} = D_b = \frac{s+t+w+x}{4} - \frac{u+v+y+z}{4}$$

Para avaliar se as modificações tem influência na robustez é necessário calcular o desvio padrão das diferenças (S_{Di}) através da Equação 4.

$$S_{Di} = \sqrt{2 \times \sum \frac{D_i^2}{7}} \quad (4)$$

Assim, a influência dos sete parâmetros analíticos foi avaliada em relação à concentração dos analitos para o método proposto.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Método MIP-MEPS desenvolvido para as triazinas

3.1.1 Otimização multivariada empregando MEPS-MIP para as triazinas

A partir das intensidades obtidas por meio do planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}), com duplicata em cada ensaio, avaliou-se o número de ciclos das etapas de condicionamento, amostragem, lavagem e eluição (Tabela 6), gerando os diagramas de Pareto, apresentados na Figura 13.

Observou-se que o condicionamento foi significativo para a simetrina e simazina, indicando que a diminuição do número de ciclos pode favorecer uma melhor resposta analítica, visto que o sinal do efeito causado por esta variável é negativo.

Tabela 6 - Variáveis e dados obtidos do planejamento fatorial 2^{4-1} .

	Fatores				Níveis				
					- (mínimo)	+ (maximo)			
	Condicionamento (C)				5	10			
	Amostragem (A)				5	10			
	Lavagem (L)				5	10			
	Eluição (E)				5	10			
Ensaio	C	A	L	E	SMZ	SMT	ATR	AME	TER
1	-	-	-	-	7144	57248	109632	151059	149627
2	+	-	-	+	6426	66227	131491	154101	136190
3	-	+	-	+	9327	69632	143336	164692	148095
4	+	+	-	-	2220	56695	112341	154924	164499
5	-	-	+	+	8263	65768	144314	158210	144282
6	+	-	+	-	2463	23975	120241	198105	198531
7	-	+	+	-	8524	60413	134272	148498	130507
8	+	+	+	+	7946	66543	142178	160211	144049
9	-	-	-	-	7218	54129	132029	129304	144695
10	+	-	-	+	5947	61565	143199	155896	133953
11	-	+	-	+	8119	73985	143699	170775	142614
12	+	+	-	-	2520	52351	121808	152816	165486
13	-	-	+	+	7407	60749	136727	148473	149422
14	+	-	+	-	2578	22753	130737	198176	206254
15	-	+	+	-	9119	65269	133675	143723	130683
16	+	+	+	+	8309	66317	140504	158841	138066

C: condicionamento; A: amostragem; L: lavagem; E: eluição

A amostragem foi significativa para a simetrina, sugerindo que o aumento do número de ciclos nesta etapa pode favorecer a resposta, provavelmente devido a uma maior interação dos analitos com MIP.

Já a variável ciclos de eluição foi significativa para os três analitos, demonstrando que é um fator de extrema importância. Esse resultado está associado à remoção dos analitos presentes no MIP, sugerindo que com um maior número de sucções pode-se obter uma melhor dessorção dos analitos presentes no MIP.

Para a ametrina e terbutrina, nenhum das fatores foi significativo. Com base nos resultados obtidos por meio da realização do planejamento fatorial fracionário, foi possível observar que diminuindo o ciclo de condicionamento e aumentando o ciclo de eluição e de amostragem, pode-se obter uma melhor eficiência do processo de extração empregado para as triazinas.

Figura 13 - Diagrama de Pareto do planejamento fatorial 2^{4-1}

Após os resultados obtidos na triagem dos fatores, realizou-se a otimização final do método por meio do planejamento de composto central. Para tanto, o ciclo de lavagem foi fixada em 5 ciclos, visto que não influenciou no processo de extração.

3.1.2 Otimização utilizando planejamento de composto central

Considerando que as variáveis significativas para estudo foram o número de ciclos de condicionamento, amostragem e eluição, realizou-se a otimização destes por meio de planejamento composto central.

Os 17 experimentos requeridos pelo planejamento são mostrados na Tabela 7. Vale lembrar que o planejamento composto central para três fatores consiste de 15 experimentos; no entanto, foram realizados experimentos no ponto central em triplicata com intuito de estimar o erro experimental.

De posse dos dados da Tabela 7, avaliou-se a significância dos modelos linear e quadrático para a resposta analítica e eficiência de cada pesticida, e foi observado que não houve falta de ajuste para os modelos propostos, com isso, construiu-se a desejabilidade para as superfícies de respostas.

Observando o gráfico de superfície (Figura 14), é possível encontrar valores de máximo para as variáveis respostas estudadas. Estes valores correspondem a 10 ciclos para amostragem e eluição e 5 ciclos para condicionamento:

Tabela 7 - Valores obtidos do planejamento composto central 2³.

	C	A	E	ATRA	AME	SMZ	SMT	TER
1	-1 (4)	-1 (8)	-1 (9)	92724	165335	17080	177965	160188
2	-1 (4)	-1 (8)	1 (11)	93225	178353	18084	182994	143062
3	-1 (4)	1 (12)	-1 (9)	106466	202408	16277	173798	176099
4	-1 (4)	1 (12)	1 (11)	106066	212376	18428	236261	124640
5	1 (6)	-1 (8)	-1 (9)	100979	172593	19012	188571	127161
6	1 (6)	-1 (8)	1 (11)	118528	201028	25240	202751	139524
7	1 (6)	1 (12)	-1 (9)	101284	183022	21027	196727	127055
8	1 (6)	1 (12)	1 (11)	111572	205585	21244	244876	157968
9	-1,68 (3)	0 (10)	0 (10)	117355	215494	24376	226444	198333
10	1,68 (7)	0 (10)	0 (10)	105410	198892	23391	223481	151159
11	0 (5)	-1,68 (7)	0 (10)	12977	252470	28675	287335	151829
12	0 (5)	1,68 (13)	0 (10)	136567	273653	29763	253822	150225
13	0 (5)	0 (10)	-1,68 (8)	108432	228897	22449	261733	165291
14	0 (5)	0 (10)	1,68 (12)	136642	235006	25134	249865	165284
15	0 (5)	0 (10)	0 (10)	139347	242396	28649	262651	174649
16	0 (5)	0 (10)	0 (10)	134574	243195	28287	263157	173365
17	0 (5)	0 (10)	0 (10)	134194	245791	28448	260543	176029

Figura 14 - Superfície de resposta relacionando A (Amostragem x Condicionamento) B (Eluição x Amostragem) e C (Eluição x Condicionamento).

3.1.3 Validação do Método MEPS-MIP para as triazinas

A linearidade do método MEPS-LC-ToF foi avaliada através de uma curva analítica (Figura 15) construída em matriz de milho fortificada em níveis diferentes (10, 20, 30, 40, 60 e 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$). As condições utilizadas para validação foram: coluna NST C18, volume de injeção 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ temperatura do forno a 35°C, vazão de 0,2 mL min^{-1} , proporção fase móvel (70:30) ACN: H_2O 0,1% ácido acético.

A faixa de quantificação analítica, o coeficiente de correlação, bem como, LQ e LD são apresentados na Figura 15 e Tabela 8.

Figura 15 - Curvas analíticas para as triazinas processadas por MEPS.

Tabela 8 - Dados obtidos das faixas de linearidade do método curva analítica MEPS-MIP para as triazinas estudadas.

Triazinas	Faixa Linear ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Coefficiente de correlação (r^2)	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Simazina	10,0 – 80,0	0,9905	3,3	10,0
Simetrina	10,0 – 80,0	0,9915	1,6	5,0
Atrazina	10,0 – 80,0	0,9941	1,6	5,0
Ametrina	10,0 – 80,0	0,9991	1,6	5,0
Terbutrina	10,0 – 80,0	0,9930	1,6	5,0

Adicionalmente, para avaliar a linearidade da curva, foi feita a construção do gráfico de resíduos em relação à área relativa (eixo y da curva). A distribuição não tendencial (heterocedástico) dos resíduos mostra que o modelo linear proposto é adequado (Figura 16).

O estudo de precisão intra-dia e inter-dias foi expresso através do desvio padrão relativo (DPR %) sendo obtidos valores abaixo de 20% para o nível baixo (LQ) e 15% para os demais níveis (Tabela 9). Os estudos de exatidão apresentaram valores aceitáveis, (abaixo de $\pm 20\%$) para o nível baixo (LQ) e $\pm 15\%$ para os demais níveis (Tabela 10).

Esses valores de referência são empregados por alguns guias de validação e órgãos regulamentadores, como por exemplo a Resolução 899 da ANVISA e as diretrizes da Comunidade Europeia.

Figura 16 - Gráfico de resíduos gerados para as triazinas em MEPS.

Tabela 9 - Precisões obtidas para o método MEPS-MIP desenvolvido para as triazinas.

Triazinas	Níveis	Precisão intra-dias 1 (%)	Precisão intra-dia 2 (%)	Precisão inter-dia (%)
Simazina	Baixo	7,9	3,7	8,8
	Médio	9,6	6,7	4,2
	Alto	5,5	12,9	1,3
Simetrina	Baixo	7,0	1,2	3,2
	Médio	5,1	13,8	14,8
	Alto	1,3	9,1	0,40
Atrazina	Baixo	3,0	5,0	8,0
	Médio	8,2	4,0	6,2
	Alto	4,6	7,5	2,5
Ametrina	Baixo	12,1	1,4	5,0
	Médio	0,40	12,6	11,7
	Alto	9,4	12,8	3,2
Terbutrina	Baixo	7,7	2,4	2,9
	Médio	7,9	3,3	5,6
	Alto	8,7	7,6	0,50

Baixo: 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$; Médio: 40,0 $\mu\text{g L}^{-1}$; Alto: 80,0 $\mu\text{g L}^{-1}$

Tabela 10 - Exatidões obtidas para o método MEPS-MIP desenvolvido para as triazinas.

Triazinas	Níveis	Exatidão inter-dia 1 (DPR %)	Exatidão intra-dia 2 (DPR %)	Exatidão inter-dia (DPR %)
Simazina	Baixo	7,3	5,2	6,0
	Médio	4,4	2,0	3,3
	Alto	1,7	3,2	3,6
Simetrina	Baixo	3,1	4,3	6,7
	Médio	3,6	1,2	1,4
	Alto	2,1	1,0	5,2
Atrazina	Baixo	4,3	3,3	3,6
	Médio	1,2	0,70	2,7
	Alto	1,7	1,1	1,4
Ametrina	Baixo	1,3	6,7	5,1
	Médio	2,1	1,5	1,4
	Alto	1,6	0,70	5,1
Terbutrina	Baixo	5,5	9,1	7,6
	Médio	1,4	0,90	2,5
	Alto	2,2	1,7	4,9

Baixo: 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$; Médio: 40,0 $\mu\text{g L}^{-1}$; Alto: 80,0 $\mu\text{g L}^{-1}$

Uma comparação da extração com o MIP e NIP também foi avaliada, foi observado que o polímero impresso sintetizado possuiu uma maior seletividade de extração para as triazinas em relação ao polímero controle (Tabela 11).

Tabela 11 - Recuperações obtidas para o método MEPS-MIP para triazinas.

Triazinas	Níveis	Recuperação MIP (%)	Recuperação NIP (%)
Simazina	Baixo	90,3	36,4
	Médio	100,1	35,3
	Alto	93,0	29,2
Simetrina	Baixo	108,7	38,9
	Médio	93,0	37,2
	Alto	91,9	41,5
Atrazina	Baixo	110,6	32,7
	Médio	100,7	32,9
	Alto	99,9	30,5
Ametrina	Baixo	107,7	38,4
	Médio	100,2	36,2
	Alto	96,1	48,6
Terbutrina	Baixo	96,7	35,3
	Médio	100,1	34,7
	Alto	106,1	34,0

Baixo: 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$; Médio: 40,0 $\mu\text{g L}^{-1}$; Alto: 80,0 $\mu\text{g L}^{-1}$

Na Tabela 12, têm-se os dados de efeito matriz obtidos para MIP-MEPS triazinas, demonstrando que para todos os analitos estudados, não demonstraram efeito matriz.

Tabela 12 - Avaliação do efeito matriz para método de MEPS-MIP.

Triazinas	Efeito Matriz (%)
Simazina	91,9
Simetrina	106,4
Atrazina	98,3
Ametrina	94,1
Terbutrina	87,5

A reprodutibilidade intralaboratorial também foi avaliada conforme descrito anteriormente em sextuplicata (Tabela 13). Os valores de precisão e exatidão deste experimento estão apresentados a seguir, e ficaram abaixo de 20 % para o nível baixo e 15 % para os demais níveis.

Tabela 13 - Resultados da reprodutibilidade intralaboratorial para método de MEPS-MIP.

Triazinas	Níveis	Concentração Média ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (DPR %)	Exatidão (%)
Simazina	Baixo	10,7	7,9	15,0
	Médio	36,1	9,8	5,5
	Alto	78,1	2,3	2,3
Simetrina	Baixo	10,9	9,5	12,7
	Médio	36,5	8,8	8,4
	Alto	87,3	9,1	5,4
Atrazina	Baixo	9,9	0,70	8,1
	Médio	37,8	5,4	7,9
	Alto	78,6	1,8	4,3
Ametrina	Baixo	9,7	2,3	13,4
	Médio	36,1	9,5	6,2
	Alto	84,5	5,6	6,7
Terbutrina	Baixo	10,2	2,6	6,0
	Médio	37,4	6,5	8,4
	Alto	77,4	3,3	4,7

Baixo: $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$; Médio: $40,0 \mu\text{g L}^{-1}$; Alto: $80,0 \mu\text{g L}^{-1}$

Os ensaios de robustez (Tabela 14) foram realizados no nível médio de fortificação ($10,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e a influência dos sete parâmetros analíticos foram calculados em função da concentração dos herbicidas.

Tabela 14 - Fatores avaliados na robustez do método MEPS-MIP para as triazinas.

Efeito	Condição Nominal		Variação	
Temperatura do forno (°C)	35	A	33	a
Fluxo da bomba analítica (mL min ⁻¹)	0,20	B	0,18	b
Proporção de ACN na fase móvel (%)	70	C	67	c
Ácido acético na fase eluente (%)	0,10	D	0,08	d
Ciclos Amostragem	10	E	7	e
Ciclos Eluição	10	F	7	f
Fluxo Nitrogênio	Lenta	G	Rápida	g

A comparação e a avaliação dos resultados da robustez estão apresentadas na Tabela 15. Por meio do teste de Youden, é possível verificar de, uma forma geral, os parâmetros que apresentam maiores influenciam no resultado final para as triazinas no MEPS (Figura 17):

- ✓ Ácido acético na fase eluente (%);
- ✓ Ciclos de eluição;
- ✓ Ciclos de amostragem;
- ✓ Fluxo de nitrogênio.

Assim, esses parâmetros devem ser cuidadosamente monitorados durante o desenvolvimento do método por MEPS e na sistemática da análise cromatográfica.

Tabela 15 - Resultados da avaliação da robustez para método MEPS para as triazinas

Concentração		Desvio Padrão (DP)	
Área absoluta 10 µg L ⁻¹	Triazinas	Robustez	Reprodutibilidade Intralaboratorial
	Simazina	1,8	6,6
	Simetrina	2,9	9,1
	Atrazina	3,3	5,9
	Ametrina	5,3	7,1
	Terbutrina	7,1	9,4

Figura 17 - Efeito dos parâmetros avaliados na robustez para as triazinas

A Figura 18, apresenta a separação cromatográfica das sulfoniluréias obtidas por LC-ESI-TOF, (A) uma solução padrão na concentração de $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e (B) após extração por MEPS na concentração de $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$. As condições utilizadas foram: coluna NST C18 (2,1 mm x 150 mm x 5 μm), volume de injeção 5 μL , temperatura do forno 35°C , vazão $0,2 \text{ mL min}^{-1}$, proporção fase móvel (40:60) ACN: H_2O com 0,1% ácido acético.

Figura 18 - Cromatograma da separação cromatográfica por LC-ESI-ToF. (A) mistura de padrão de herbicidas da classe das triazinas ($50,0 \mu\text{g L}^{-1}$). (B), eluato de uma amostra de milho ($10,0 \mu\text{g kg}^{-1}$) após extração por MEPS.

3.2 Método MEPS-MIP desenvolvido para as sulfoniluréias

3.2.1 Otimização multivariada empregando MEPS para as sulfoniluréias

A Tabela 16, apresenta os dados obtidos a partir do planejamento fatorial completo 2^3 e a Figura 19 os diagramas de Pareto para os analitos estudados, no qual é possível observar a influência das variáveis estudadas.

Pode-se observar que a única variável que foi significativa frente às estudadas foi o volume de eluição, sugerindo que com uma diminuição do volume de eluição é possível obter-se uma melhor resposta analítica. Avaliou-se também o fator de concentração, o qual está associado diretamente com o volume de dessorção dos analitos. Com isso, realizou-se um experimento univariado, variando os volumes de eluição, cujos resultados são mostrados na Figura 19.

Tabela 16 - Variáveis e dados obtidos do planejamento completo 2^3 .

Fatores				Níveis			
				- (mínimo)	+ (máximo)		
Amostragem (A)				4	8		
Eluição (E)				4	8		
Volume eluição (VE)				4	8		
Ensaios	A	E	VE	TFS	CLS	TBN	BEN
1	-	-	-	126766	60961	146464	125767
2	+	-	-	145813	72872	192831	120972
3	-	+	-	161740	72991	213397	165950
4	+	+	-	147983	69110	211100	128302
5	-	-	+	64115	33631	106329	57359
6	+	-	+	70428	37939	113469	107379
7	-	+	+	72376	35910	109108	74270
8	+	+	+	67287	38055	102215	55075

TFS, thifensulfuron; CLS, clorosulfuron; TBN, tribenuron; BEN, bensulfon

Figura 19 - Diagrama de Pareto do planejamento completo 2^3

Figura 20 - Teste univariado de influência do volume de eluição.

Podemos observar que quando variamos volumes de eluição entre 50-100 µL, não obtivemos sequer diferença na intensidade para os herbicidas; valores acima permitem observar uma diminuição significativa da intensidade. Um dos fatores, é o maior volume de solvente diluindo, assim, a concentração dos analitos, como pode ser observado na Figura 20. Utilizando um menor volume de solvente para eluição, espera-se obter uma melhor resposta, pois aumenta o fator de pré-concentração frente aos analitos das sulfoniluréias.

Com isso, optou-se por fixar o volume de eluição em 50µL, assim alcançando um fator de pré-concentração de 10 vezes. As demais variáveis, tais como ciclos de amostragem e eluição, foram fixadas em 8 ciclos, e os ciclos de lavagem e condicionamento foram fixados em 4 ciclos, a fim de obter uma melhor adsorção e dessorção dos analitos, respectivamente.

3.2.2 Validação do método MEPS-MIP para as sulfoniluréias

O protocolo de validação utilizado foi similar ao descrito no item 3.1.3.

A linearidade do método foi avaliada através da curva analítica (Figura 21) construída em amostras fortificadas de milho (2,5, 5,0, 10,0, 20,0, 30,0, 40,0 µg L⁻¹). A faixa de quantificação analítica, o coeficiente de correlação e as equações de regressão linear para cada pesticida estão apresentados na Figura 21 e Tabela 17. As condições utilizadas para validação foram: coluna NST C18, volume de injeção 5 µL, temperatura

do forno 35°C, vazão 0,2 mL min⁻¹, proporção fase móvel (40:60) ACN: H₂O com 0,1% ácido acético.

Figura 21 - Curvas analíticas para as sulfoniluréias processadas por MEPS.

Tabela 17 - Dados obtidos das faixas de linearidade do método curva analítica MEPS-MIP para as sulfoniluréias estudadas.

Sulfoniluréias	Faixa Linear ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Coefficiente de correlação (r^2)	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Thifensulfuron	2,5 – 40,0	0,9951	0,83	2,5
Clorosulfuron	2,5 – 40,0	0,9943	0,83	2,5
Tribenuron	2,5 – 40,0	0,9940	0,83	2,5
Bensulfuron	2,5 – 40,0	0,9956	0,83	2,5

Adicionalmente, para avaliar a linearidade da curva, foi construído um gráfico de resíduos em relação à área relativa (eixo y da curva). A distribuição não tendencial

(heterocedástico) dos resíduos mostra que o modelo linear proposto é adequado (Figura 22).

Figura 22 - Gráfico de resíduos gerados para as sulfoniluréias em MEPS.

Os estudos de precisão intra-dia e inter-dias foram expressos em desvio padrão relativo (DPR, %) sendo os valores aceitáveis pelos protocolos utilizados abaixo de 20 % para o nível baixo e 15 % para os demais níveis (Tabela 18).

Já os estudos de exatidão intra-dia e inter-dias foram expressos em percentagem de desvio na qual os valores aceitáveis também são abaixo de 20 % para o nível baixo e 15 % para os demais níveis (Tabela 19).

A reprodutibilidade intralaboratorial também foi avaliada conforme descrito anteriormente, também em sextuplicata. Os valores de precisão e exatidão deste experimento estão apresentados na Tabela 20 e ficaram abaixo de 20 % para o nível baixo e 15 % para os demais níveis, demonstrando a reprodutibilidade para o método proposto.

Tabela 18 - Precisões obtidas para o método MEPS-MIP desenvolvido para sulfonilúreias.

Sulfoniluréias	Níveis	Precisão intra-dias 1 (%)	Precisão intra-dia 2 (%)	Precisão inter-dia (%)
Thifensulfuron	Baixo	14,2	12,0	13,1
	Médio	4,2	7,0	5,6
	Alto	10,5	4,3	7,4
Clorosulfuron	Baixo	8,2	10,5	9,3
	Médio	5,0	13,5	9,2
	Alto	9,6	7,3	1,2
Tribenuron	Baixo	12,7	5,9	9,3
	Médio	4,5	1,5	1,5
	Alto	4,5	5,7	5,1
Bensulfuron	Baixo	8,1	9,3	8,7
	Médio	13,6	14,2	13,9
	Alto	6,0	8,8	7,4

Baixo: 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$; Médio: 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$; Alto: 40,0 $\mu\text{g L}^{-1}$

Tabela 19 - Exatidões obtidas para o método MEPS- MIP desenvolvido para sulfonilúreias.

Sulfoniluréias	Níveis	Exatidão intra- dia 1 (DPR %)	Exatidão intra- dia 2 (DPR %)	Exatidão inter- dia (DPR %)
Thifensulfuron	Baixo	6,0	11,4	13,5
	Médio	4,8	2,6	4,3
	Alto	2,7	9,7	9,3
Clorosulfuron	Baixo	4,8	5,3	8,0
	Médio	10,2	8,5	11,3
	Alto	13,6	12,2	11,8
Tribenuron	Baixo	4,2	4,2	6,9
	Médio	2,2	3,9	2,8
	Alto	1,4	0,90	3,1
Bensulfuron	Baixo	3,1	8,2	9,3
	Médio	9,0	4,0	10,0
	Alto	10,1	5,2	9,4

Baixo: 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$; Médio: 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$; Alto: 40,0 $\mu\text{g L}^{-1}$

Tabela 20 - Resultados da reprodutibilidade intralaboratorial para método de MEPS-MIP desenvolvido para as sulfoniluréias.

Sulfoniluréias	Níveis	Concentração Média ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (DPR %)	Exatidão (%)
Thifensulfuron	Baixo	3,3	4,2	2,3
	Médio	22,6	13,2	1,0
	Alto	35,5	9,3	2,9
Clorosulfuron	Baixo	2,6	0,60	14,8
	Médio	20,1	0,30	7,4
	Alto	41,2	5,3	2,5
Tribenuron	Baixo	2,7	2,0	7,1
	Médio	20,2	1,2	1,6
	Alto	40,4	2,2	4,6
Bensulfuron	Baixo	2,7	5,2	10,4
	Médio	19,7	1,4	0,90
	Alto	40,1	3,8	5,7

Baixo: $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$; Médio: $20,0 \mu\text{g L}^{-1}$; Alto: $40,0 \mu\text{g L}^{-1}$

A partir do método de MEPS desenvolvido e otimizado para análise de amostras de milho, foi realizado um estudo preliminar avaliando o efeito matriz em amostras de milho fortificado. O efeito matriz foi avaliado de acordo com o trabalho de Matuszewski et. al (7). Na Tabela 21 observamos que o efeito de matriz para o método não foi relevante para os analitos estudados. Mesmo diante da complexidade das amostras de milho, o método de MEPS possibilitou a determinação e identificação de todas as sulfoniluréias estudadas, e os resultados foram pouco influenciados pelos interferentes presentes na matriz.

Os ensaios de robustez (Tabela 22) foram realizados no nível baixo de fortificação ($2,5 \mu\text{g kg}^{-1}$) e a influência dos sete parâmetros analíticos foi calculada em função da concentração dos herbicidas (Tabela 23).

Tabela 21 - Valores de efeito matriz do método MEPS-MIP desenvolvido para as sulfoniluréias.

Sulfoniluréias	Efeito Matriz (%)
Thifensulfuron	95,3
Clorosulfuron	102,4
Tribenuron	89,1
Bensulfuron	98,9

Tabela 22 - Fatores avaliados na robustez do método MEPS-MIP desenvolvido para as sulfoniluréias.

Efeito	Condição Nominal		Variação	
Temperatura do forno (°C)	35	A	33	a
Fluxo da bomba analítica (mL min ⁻¹)	0,20	B	0,18	b
Proporção de ACN na fase móvel (%)	40	C	37	c
Ácido acético na fase eluente (%)	0,10	D	0,08	d
Ciclos Amostragem	8	E	5	e
Ciclos Eluição	8	F	5	f
Ciclos Condicionamento	4	G	2	g

Tabela 23 - Resultados da avaliação da robustez para método MEPS-MIP.

Concentração		Desvio Padrão (DP)	
2,5 µg kg ⁻¹			Reprodutibilidade
	Sulfoniluréias	Robustez	Intralaboratorial
	Thifensulfuron	3,3	5,2
	Clorosulfuron	2,6	4,8
	Tribenuron	4,2	6,9
	Bensulfuron	1,9	3,5

Por meio do teste de Youden é possível verificar, de uma forma geral, os parâmetros que apresentam maiores influenciam no resultado final para as sulfoniluréias empregando MEPS (Figura 23):

- ✓ Proporção ACN na fase móvel;
- ✓ Ciclos de amostragem;
- ✓ Ciclos de eluição;
- ✓ Ciclos de condicionamento.

Assim, esses parâmetros devem ser cuidadosamente monitorados durante a aplicação do método de extração por MEPS e na sistemática da análise cromatográfica.

A Figura 24 apresenta a separação cromatográfica obtida por LC-ESI-TOF, após extração por MEPS para as sulfoniluréias. As condições utilizadas foram: concentração $20 \mu\text{g kg}^{-1}$, coluna NST C18 (2,1 mm x 150 mm x 5 μm), volume de injeção 5 μL , temperatura do forno 35°C , vazão $0,2 \text{ mL min}^{-1}$, proporção fase móvel (40:60) ACN: H_2O com 0,1% ácido acético.

Figura 23- Efeito dos parâmetros avaliados na robustez para MIP-MEPS das sulfoniluréias.

Figura 24 - Cromatograma da separação cromatográfica por LC-ESI-ToF para as sulfoniluréias

3.3 Comparação do método MEPS-MIP com outros sorventes comercialmente disponíveis

Além disso, o desempenho do MIP sintetizado foi comparado positivamente com outros materiais sintetizados e comercialmente disponíveis não seletivos.

O material NIP, com base na mesma afinidade química, mas sem adição da molécula molde durante a síntese, é um bom exemplo para a eficiência comparativa do MIP, mostrando rendimentos de recuperação $< 40\%$ sob a mesma condição. Sorventes comerciais baseados em sílica-C18, Strata X e alumina, também foram analisados, sendo possível observar os baixos rendimentos de recuperação (Figura 25). Aplicou-se o método de MEPS para a extração dos analitos, demonstrando que o elevado desempenho do MIP, tanto na seletividade e capacidade adsorptiva, se comparado com os materiais testados e a vantagem da impressão molecular durante a síntese.

Figura 25 - Comparação entre os MIPs sintetizados com outros sorventes comercialmente disponíveis

3.4 Aplicação em amostras de milho

Após o método ter sido desenvolvido, otimizado e validado, o mesmo foi aplicado em 5 amostras de milho, obtidas em diferentes estabelecimentos, a fim de avaliar a aplicabilidade do método (Tabelas 24 e 25).

Primeiramente, realizou-se o preparo da amostra sem contaminação, afim de avaliar se nas amostras em branco encontraria estes herbicidas. Como não foi encontrado, optou-se por fortificar as amostras em concentrações distintas, afim de avaliar a aplicabilidade do método desenvolvido.

1 g de milho moído foi enriquecido com quantidades conhecidas dos herbicidas e, em seguida, adicionou-se 5 mL de acetonitrila. A mistura ficou em agitação mecânica por aproximadamente 6 horas sendo, em seguida, homogenizada no ultrassom por aproximadamente 60 minutos à 45°C, seguida de uma filtração a vácuo e evaporação sob fluxo de N₂ (9). O resíduo foi ressuscendido com 1 mL ACN. A amostra foi homogenizada no ultrassom por 15 minutos, seguida por centrifugação a 10000 rpm por 5 minutos e transferida para *vials* apropriados que foram levados ao amostrador automático do HPLC.

Como pode ser observada nas Tabelas 24 e 25, os valores de exatidão dos métodos foram adequados para todas as amostras de milho analisadas com base nos percentuais de recuperação entre MIP-MEPS triazinas (81,0 a 119,9%), tanto MIP-MEPS sulfoniluréias (81,4 a 119,8%), demonstrando a aplicabilidade dos métodos desenvolvidos.

Tabela 24 - Recuperação triazinas empregando MEPS-MIP para as triazinas (n = 5).

Triazinas	Conc. ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Milho 1 (% $\pm$ RSD)	Milho 2 (% $\pm$ RSD)	Milho 3 (% $\pm$ RSD)	Milho 4 (% $\pm$ RSD)	Milho 5 (% $\pm$ RSD)
Atrazina	10,0	112,5 $\pm$ 1,4	100,2 $\pm$ 1,7	102,0 $\pm$ 4,7	99,4 $\pm$ 4,6	107,5 $\pm$ 5,2
	120,0	109,3 $\pm$ 0,90	106,1 $\pm$ 2,1	107,9 $\pm$ 5,4	103,9 $\pm$ 6,1	102,4 $\pm$ 3,8
	500,0	107,7 $\pm$ 1,7	100,9 $\pm$ 2,8	91,8 $\pm$ 3,6	113,9 $\pm$ 0,60	116,0 $\pm$ 0,70
Ametrina	10,0	93,3 $\pm$ 5,7	114,5 $\pm$ 5,2	116,0 $\pm$ 2,8	114,4 $\pm$ 3,1	116,3 $\pm$ 4,7
	120,0	116,5 $\pm$ 1,0	102,4 $\pm$ 5,1	105,4 $\pm$ 4,5	113,9 $\pm$ 0,70	109,3 $\pm$ 4,9
	500,0	88,6 $\pm$ 2,2	106,9 $\pm$ 1,9	81,0 $\pm$ 1,7	115,5 $\pm$ 1,7	114,4 $\pm$ 1,6
Simazina	10,0	89,0 $\pm$ 5,9	84,0 $\pm$ 7,1	98,6 $\pm$ 7,1	84,9 $\pm$ 8,0	105,1 $\pm$ 4,0
	120,0	108,6 $\pm$ 3,2	87,1 $\pm$ 1,5	95,3 $\pm$ 4,3	103,2 $\pm$ 1,9	105,2 $\pm$ 2,7
	500,0	87,1 $\pm$ 3,2	98,5 $\pm$ 0,90	90,5 $\pm$ 1,7	103,7 $\pm$ 1,0	107,0 $\pm$ 0,60
Simetrina	10,0	119,9 $\pm$ 3,3	110,9 $\pm$ 2,3	118,6 $\pm$ 2,8	119,1 $\pm$ 4,6	99,0 $\pm$ 6,9
	120,0	94,9 $\pm$ 3,1	93,7 $\pm$ 1,1	95,1 $\pm$ 7,7	103,9 $\pm$ 6,1	97,6 $\pm$ 5,1
	500,0	114,5 $\pm$ 0,80	117,8 $\pm$ 2,0	99,4 $\pm$ 0,60	112,9 $\pm$ 5,1	116,7 $\pm$ 3,7
Terbutrina	10,0	107,9 $\pm$ 6,5	113,1 $\pm$ 2,4	111,8 $\pm$ 2,2	113,4 $\pm$ 3,6	117,0 $\pm$ 3,6
	120,0	107,4 $\pm$ 2,9	101,3 $\pm$ 1,2	99,2 $\pm$ 2,7	102,5 $\pm$ 5,6	104,6 $\pm$ 4,2
	500,0	85,8 $\pm$ 1,7	105,9 $\pm$ 2,8	106,7 $\pm$ 1,3	102,1 $\pm$ 0,90	105,1 $\pm$ 4,7

Tabela 25 - Recuperação triazinas empregando MEPS-MIP para as sulfoniluréias (n = 5).

Sulfoniluréias	Conc. (mg kg^{-1})	Milho 1 (% $\pm$ RSD)	Milho 2 (% $\pm$ RSD)	Milho 3 (% $\pm$ RSD)	Milho 4 (% $\pm$ RSD)	Milho 5 (% $\pm$ RSD)
Thifensulfuron	2,5	82,5 $\pm$ 3,2	91,6 $\pm$ 1,4	93,6 $\pm$ 4,1	87,2 $\pm$ 2,7	95,8 $\pm$ 1,1
	20,0	98,9 $\pm$ 0,70	101,9 $\pm$ 0,60	97,1 $\pm$ 1,8	92,6 $\pm$ 3,2	104,9 $\pm$ 3,6
	60,0	99,2 $\pm$ 1,5	93,8 $\pm$ 0,50	98,8 $\pm$ 0,90	99,0 $\pm$ 1,3	87,9 $\pm$ 4,9
Clorosulfuron	2,5	116,8 $\pm$ 2,4	119,2 $\pm$ 1,7	114,4 $\pm$ 3,9	105,2 $\pm$ 2,9	108,3 $\pm$ 2,7
	20,0	96,4 $\pm$ 0,30	95,2 $\pm$ 0,80	98,2 $\pm$ 1,7	103,6 $\pm$ 2,9	91,8 $\pm$ 3,9
	60,0	102,7 $\pm$ 0,30	96,4 $\pm$ 0,4	95,2 $\pm$ 0,80	98,2 $\pm$ 1,7	95,7 $\pm$ 2,1
Tribenuron	2,5	89,2 $\pm$ 3,8	110,7 $\pm$ 3,5	86,3 $\pm$ 1,8	104,9 $\pm$ 4,9	97,3 $\pm$ 4,2
	20,0	119,8 $\pm$ 4,4	114,0 $\pm$ 3,5	110,3 $\pm$ 2,5	104,2 $\pm$ 1,7	107,9 $\pm$ 3,1
	60,0	114,9 $\pm$ 1,7	112,0 $\pm$ 1,6	112,2 $\pm$ 2,9	108,9 $\pm$ 1,7	103,9 $\pm$ 1,9
Bensulfuron	2,5	104,1 $\pm$ 4,2	81,4 $\pm$ 1,8	84,3 $\pm$ 1,5	98,5 $\pm$ 2,9	94,8 $\pm$ 3,7
	20,0	99,6 $\pm$ 1,2	97,5 $\pm$ 1,6	101,6 $\pm$ 1,2	103,8 $\pm$ 2,4	89,5 $\pm$ 1,1
	60,0	114,9 $\pm$ 1,7	112,0 $\pm$ 1,6	101,7 $\pm$ 2,9	109,0 $\pm$ 1,7	105,8 $\pm$ 2,5

4 CONCLUSÃO

Os materiais sintetizados apresentaram bons resultados de seletividade quando comparados com o NIP e também a outros sorventes comercialmente disponíveis, na retenção dos herbicidas de interesse para o método MEPS. Apresentaram uma tendência de análises simples, rápidas, reprodutíveis e resultados adequados para os parâmetros já validados.

Os métodos empregando a técnica MEPS desenvolvidos possibilitaram a análise das triazinas e sulfoniluréias, onde foi possível isolar e concentrar os analitos de interesse, removendo os interferentes da matriz e garantindo ainda resultados com altas taxas de recuperação. A aplicabilidade do método foi demonstrada através da análise de amostras de milho fortificadas, possibilitando a detecção e quantificação dos herbicidas.

REFERÊNCIAS

- 1 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.
- 2 ANDRADE, F. N.; SANTOS-NETO, Á. J.; LANÇAS, F. M. Microextraction by packed sorbent liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry of triazines employing a molecularly imprinted polymer. **Journal of separation science**, v. 37, n. 21, p. 3150–6, 2014.
- 3 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA e ABASTECIMENTO. **Manual de Garantia da Qualidade Analítica - Resíduos e contaminantes em Alimentos**. p. 227, 2011.
- 4 CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021–1030, 2009c.
- 5 MAPA LANAGRO. **Manual de validação, verificação/confirmação de desempenho, estimativa da incerteza de medição e controle de qualidade intralaboratorial**. p.38, 2014.
- 6 **Resolução-RE N°899, de 29 de maio de 2003**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Asunto+de+Interesse/Equivalencia+farmaceutica/Legislacoes.>> Acesso em: 21 set. 2015.

7 CE 657 - Desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, p. 8–36, 2002.

8 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.

9 XU, S.; LI, J.; CHEN, L. Molecularly imprinted polymers by reversible addition-fragmentation chain transfer precipitation polymerization for preconcentration of atrazine in food matrices. *Talanta*, v. 85, n. 1, p. 282–9, 2011

Capítulo 4

Microextração Adsorptiva em Barra - BAμE

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

O objetivo desse capítulo foi estudar o emprego dos MIPs na técnica BA μ E, avaliando o seu desempenho para herbicidas das triazinas e sulfoniluréias. O uso desse dispositivo na análise dos compostos de interesse, com aplicações em amostras de milho, foi avaliado, otimizado e validado, utilizando-se a cromatografia líquida na etapa de separação e detecção dos analitos.

1.2 Específicos

(1) Avaliar o emprego dos MIPs empregando a BA μ E como técnica miniaturizada de preparo de amostras, com posterior análise cromatográfica;

(2) Otimizar todo processo de extração do dispositivo de BA μ E a fim de obter melhores resultados durante o processo de preparo da amostra;

(3) Validar e aplicar as metodologias desenvolvidas na análise dos compostos de interesse em amostras de milho.

2 Parte Experimental

2.1 Padrões e Reagentes

No presente estudo, quatro triazinas (ametrina, atrazina, simazina e terbutrina) e quatro sulfoniluréias (bensulfuron, clorosulfuron, thifensulfuron e tribenuron) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha)..

Todos os reagentes utilizados apresentavam certificação analítica. O metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) com grau HPLC foram fornecidos pela Fisher Scientific (99,8 %; UK) e Carlo Erba (99,9 %; Arese, Itália).

O cloreto de sódio (NaCl; 99,5 %) foi fornecido pela Panreac (Espanha). O hidróxido de sódio (NaOH; 98,0 %) foi fornecido pela AnalaR (BDH chemicals, UK). O

ácido clorídrico (HCl; 37 %) e o ácido acético (HAc) foram fornecidos pela Panreac (Espanha).

A água ultrapura foi obtida através de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, EUA).

2.2 Análises em HPLC-DAD

Utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção por rede de diodos (HPLC-DAD) marca Agilent Technologies série 1100. O equipamento é constituído por diferentes módulos: desgaseificador (G1322A), bomba quaternária (G1311A), amostrador automático (G1313A), compartilhamento de coluna termostatizado (G1316A) e detector de rede de diodos (G1315B). O registro de dados utilizou o software LC3D ChemStation, Agilent Technologies. De acordo com os dados obtidos, seleccionou-se o comprimento de onda de 235 nm, uma vez que apresentou ao máximo de absorção (λ_{max}) para os herbicidas estudados. A fase móvel foi constituída por MeOH e H₂O na proporção de (65:35, v/v) com uma coluna convencional de fase reversa C18 (150 mm x 4,6 mm, 2,6 μm ; Phenomenex, EUA) a 20 °C, seguida por separação cromatográfica em modo isocrático, que permitiu obter um boa resposta instrumental com para as classes de triazinas e sulfoniluréias, em tempo analítico adequado (< 12 min).

2.3 Preparação dos dispositivos para microextração – BA μ E

A preparação de todos os dispositivos analíticos foi efetuada no próprio laboratório de acordo com Almeida e Nogueira (1). A geometria cilíndrica em forma de barra foi obtida revestindo-se pequenas barras em polipropileno com adesivo adequado sendo, posteriormente, revestido com o material sorvente. Os dispositivos miniaturizados BA μ E, possuíam comprimento de 7,5 mm e diâmetro de 3 mm.

2.4 Procedimento para extração

Os ensaios de microextração, utilizados para o processo de otimização das metodologias, foram realizados com 25 mL de água ultrapura em frascos de vidro com capacidade de 25 mL, nas quais foi introduzida uma barra de agitação magnética em teflon. Posteriormente, foi colocado na solução o dispositivo de microextração, sendo a água fortificada a partir de uma solução padrão estoque e o frasco selado rapidamente. Em seguida, a microextração foi promovida por força de agitação magnética a uma determinada velocidade e tempo de extração à temperatura ambiente (25 °C). Todos os ensaios foram efetuados em triplicatas. Foram igualmente realizados ensaios em branco, que correspondem a todo o processo experimental descrito, mas usando água ultrapura sem adição de padrão.

O MIP foi utilizado como sorvente para a sorção das triazinas e sulfoniluréias no formato BAμE, tendo como passo seguinte a otimização de vários parâmetros que podem afetar a eficiência da técnica, a fim de obter a melhor resposta analítica. Assim, estudos sistemáticos foram efetuados em água ultrapura fortificada (8,0 μg L⁻¹), para otimizar os parâmetros mais importantes que podem afetar a eficiência da BAμE.

2.5 Procedimento para dessorção

Na etapa da dessorção, o dispositivo de microextração foi retirado do frasco de amostragem e seco em papel limpo. Em seguida, o dispositivo de microextração foi introduzido num “*insert*” contendo 200 μL de solvente apropriado e colocado no interior de um vial de 1,5 mL.

Os dispositivos de microextração, ao serem colocados no solvente para a dessorção, devem ficar imersos e o vial deve ser rapidamente selado, e em seguida submetido a tratamento ultrassônico por um período de tempo, que deve ser otimizado. Posteriormente o dispositivo de dessorção é retirado, e o *vial* rapidamente selado. Em seguida a dessorção, os extratos contidos nos vials, foram analisados por HPLC-DAD. Todos os ensaios foram efetuados em triplicatas.

2.6 Otimização da eficiência da BA μ E

A otimização dos parâmetros de extração da BA μ E, é de fundamental importância, pois tem como principal objeto, obter os melhores parâmetros para os analitos e sorventes em estudo. As condições a serem otimizadas foram: solvente de dessorção (ACN, MeOH, ACN:MeOH, ACN:HAc e MeOH:ACN (1:1, v/v)), tempo de dessorção (15, 30, 45, 60 e 90 min), velocidade de agitação (750, 1000 e 1250 rpm), tempo de extração (1, 2, 3 e 16 h), pH (2,0, 4,0, 5,5, 8,0, 10,0), a força iônica (0, 5, 10 e 15%, NaCl (p/v) e modificador orgânico (0, 5, 10 e 15% MeOH, (v/v)). Após a otimização, realizou-se a validação dos métodos (2).

2.7 Emprego de BA μ E na análise de triazinas e sulfoniluréias em amostras de milho

Após o método ter sido desenvolvido, otimizado e validado, ele foi aplicado em amostras de milho, obtido em diferentes estabelecimentos, a fim de avaliar a aplicabilidade do método. Em 15 g de milho moído, adicionou-se 15 mL de acetonitrila e em seguida a mistura foi fortificada em concentrações conhecidas de herbicidas. A mistura ficou no ultrassom por aproximadamente 60 minutos, seguida de uma filtração à vácuo e dividida nos *vials* de extração. 1 mL da amostra foi adicionada a 24 mL de H₂O; em seguida realizou-se o processo de microextração BA μ E, seguido da análise por HPLC-DAD.

As condições utilizadas para avaliação do preparo da amostra no método foram: coluna C18 (150mm, 4,6 mm x 2,6 μ m), volume de injeção 20 μ L, temperatura do forno a 20°C, vazão 0,5 mL min⁻¹, fase móvel MeOH:H₂O, (65:35, v:v) acidificada com 5% ácido acético, operando no comprimento de onda de 235 nm.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 MÉTODO BA μ E(MIP) DESENVOLVIDO PARA AS TRIAZINAS

3.1.1 ESTUDO DO EFEITO DOS PARÂMETROS DA BA μ E(MIP)-LD

As primeiras variáveis estudadas foram, o efeito do tipo de solvente e o tempo de dessorção, a fim de obter as condições ideais que promovem uma melhor dessorção dos analitos na BA μ E.

Diversos solventes como ACN, MeOH, misturas de ACN/MeOH, ACN/HAc e MeOH/HAc (1:1, v/v) foram testados. A escolha do melhor solvente é de grande importância, uma vez que deve ter força suficiente para a remoção das triazinas no MIP. A Figura 26a, mostra o perfil obtido para os solventes testados sob banho ultrassônico, através da figura, podemos observar que o MeOH, promove uma melhor eficiência para os herbicidas estudados, tendo este sido o selecionado para o processo de dessorção em estudos posteriores. Em seguida foi realizada a avaliação do tempo de tratamento ultrassônico durante a μ LD, em diferentes tempos de 30, 45, 60 e 90 min. Pelo perfil obtido na Figura 26b é possível observar que a partir de 60 min, ocorre uma melhor dessorção dos analitos, tendo este sido o tempo escolhido.

A velocidade de agitação e o tempo de equilíbrio, também são variáveis que desempenham um papel fundamental nos processos de extrações, pois são responsáveis pela cinética entre os analitos e o sorvente (MIP), durante o processo de enriquecimento por flutuação (3). Os ensaios testados para a velocidade de agitação foram 750, 1000 e 1250 rpm à temperatura ambiente, a de 1000 rpm foi a que apresentou uma pequena vantagem se comparada com as outras estudadas, Figura 27a.

Pode-se observar que velocidades superiores a 1000 rpm afetam de forma negativa o processo de extração devido, provavelmente, a turbulência que perturba o dispositivo de microextração. Assim, dificulta a interação entre o sorvente e a fase líquida, promovendo uma diminuição na adsorção dos analitos. Deste modo, 1000 rpm foi selecionado para estudos posteriores.

Figura 26 - Recuperações médias obtidas: (a) no estudo do solvente para dessorção em meio aquoso; (b) no estudo do tempo para dessorção; Condições - extração: 25 mL ($8,0 \mu\text{g L}^{-1}$), 1000 rpm, 16 h, pH 5,5; μ LD.

Figura 27 - Recuperações médias obtidas: (a) no estudo de velocidade de agitação; (b) no estudo de tempo de equilíbrio. Condições - extração: 25 mL ($8,0 \mu\text{g L}^{-1}$), 16 h, pH 5,5; μLD : 200 μL MeOH durante 60 min sob banho ultrassônico.

Posteriormente, o tempo de extração foi outro parâmetro avaliado; foram realizados ensaios em diferentes tempos (1, 2, 3 e 16 h). Desse modo, foi possível avaliar a interação entre os analitos em solução e o MIP baseada num processo de equilíbrio, o qual depende do tempo de exposição entre a fase sólida e líquida (4). A Figura 27b, mostra o perfil obtido para os tempos de extração estudados, verifica-se um aumento gradual na recuperação média, tendo alcançada máxima eficiência no tempo de 16 h de extração. Assim, o tempo de 16 h foi selecionado para estudos posteriores.

As características da matriz também foram estudadas, incluindo, o pH, força iônica e polaridade. Realizou-se ensaios para avaliar o comportamento da eficiência da BA μ E para as triazinas em estudo, em diferentes valores de pH (2,0, 4,0, 5,5, 8,0 e 10,0) à temperatura ambiente. O pH da matriz é um parâmetro de extrema importância, uma vez poder influenciar a forma molecular dos analitos em solução e a carga superficial do sorvente para a microextração, afetando diretamente a eficiência do processo (5). A Figura 28a, mostra o perfil de recuperações obtidas para o efeito do pH, onde observamos uma diminuição para valores ácidos e básicos. Isso ocorre devido a presença de espécies iônicas em solução, enquanto em meio ácido ocorre a protonação em meio básico acontece a desprotonação dos íons em solução, influenciando, assim, na adsorção dos analito. Contudo, o pH 5,5 foi o selecionado para estudos posteriores.

A força iônica pode ser alterada pela adição de um eletrólito, que pode favorecer a migração de compostos orgânicos para o sorvente, bem como a eficiência do processo de microextração, nomeadamente para os compostos mais polares. O aumento da recuperação dos analitos mais polares pela adição de sais, é devido ao chamado efeito de

salting-out, o qual é baseado na redução da solubilidade dos analitos, promovendo a migração dos mesmo para o sorvente (6). Neste sentido, foram realizados ensaios com adição de NaCl contendo porcentagens de 0, 5, 10 e 15 % (p/v) em água ultrapura à temperatura ambiente, tendo-se verificado que não há vantagem na adição na eficiência do processo de microextração, a qual é fortemente reduzida para os analitos estudados Figura 28b.

O último parâmetro a ser estudado foi a polaridade da matriz, que pode ser alterada ou controlada pela adição de um solvente orgânico, conhecido como *wall-effect*. Esse acontecimento baseia-se na adsorção de compostos com características mais hidrofóbicas nas paredes dos frascos de amostragem, reduzindo o processo de eficiência de microextração (7). Assim, foram realizados ensaios com a adição de MeOH contendo porcentagens de 0, 5, 10 e 15 % (v/v) em água ultrapura, (Figura 28c). Observa-se uma redução gradual na eficiência média para todos os analito. Deste modo, para estudos posteriores, a metodologia proposta foi desenvolvida sem a adição de NaCl e MeOH.

Figura 28- Recuperações médias obtidas: (a) no estudo de pH; (b) adição NaCl; (c) adição MeOH. Condições extração: 25 mL ($8,0 \mu\text{g L}^{-1}$), 1000 rpm, 16 h, μLD : 200 μL MeOH durante 60 min sob tratamento ultrassônico.

3.2 Validação do método proposto para as triazinas

Após otimizados os parâmetros que podem afetar o desempenho analítico da metodologia proposta, BA μ E(MIP)- μ LD/HPLC-DAD, estabeleceram-se as condições experimentais ótimas para prosseguir com a validação do método, usando as seguintes condições – BA μ E(MIP): 25 mL, 1000 rpm, 16 h, pH 5,5; μ LD: MeOH 200 μ L, 60 min sob tratamento ultrassônico.

A linearidade do método (Figura 29) foi avaliada através da curva analítica construída em de água ultrapura, fortificada nas seguintes concentrações (0,80, 2,0, 4,0, 8,0, 12,0, 16,0, 20,0 e 24,0 μ g kg⁻¹). Também construiu-se a curva analítica na matriz (Figura 30), empregando-se as seguintes concentrações: 0,0, 4,0, 8,0, 12,0 e 16,0 μ g kg⁻¹. A faixa de quantificação analítica, o coeficiente de correlação, LDs e LQs para cada herbicida estão apresentados na Tabela 26.

Figura 29 - Linearidade do método BA μ E(MIP)- μ LD/HPLC-DAD determinada em água ultrapura.

Figura 30 - Linearidade do método BaμE(MIP)-μLD/HPLC-DAD determinada em amostras de milho.

Adicionalmente, para avaliar a linearidade da curva, foi feita a construção do gráfico de resíduos em relação à área relativa (eixo y da curva) (Figura 31).

Tabela 26 - Dados obtidos das faixas de linearidade do método curva analítica BaμE(MIP) para as triazinas estudadas.

Triazinas	Faixa Linear (μg L ⁻¹)	Coefficiente de determinação	Coefficiente de determinação	LD (μg L ⁻¹)	LQ (μg L ⁻¹)
		Água (r^2)	Miho (r^2)		
Ametrina	0,80 – 24,0	0,9972	0,9867	0,20	0,70
Simazina	0,80 – 24,0	0,9938	0,9881	0,20	0,70
Atrazina	0,80 – 24,0	0,9926	0,9968	0,20	0,70
Terbutrina	0,80 – 24,0	0,9957	0,9846	0,20	0,70

Figura 31 - Gráfico de resíduos do método BAμE(MIP)-μLD/HPLC-DAD

Os estudos de precisão e exatidão intra-dia e inter-dias foram expressos em desvio padrão relativo (DPR, %) e percentagem de desvio, respectivamente, sendo os valores aceitáveis, como visto anteriormente, são abaixo de 20 % para o nível baixo e 15 % para os demais níveis (Tabelas 27 e 28). O efeito matriz também foi avaliado (Tabela 29), conforme discutido anteriormente.

A Figura 32, apresenta os cromatogramas obtidos, após a extração de BAμE tanto para MIP quanto para NIP, demonstrando, como para o MIP apresenta uma melhor afinidade. As condições experimentais foram: coluna C18 (150 mm x 4.6 mm, 2.6μm; Phenomenex), volume de injeção 20 μL, temperatura do forno 30 °C, vazão 0,5 mL min⁻¹, proporção fase móvel (65:35) MeOH: H₂O com 0,1% ácido acético, concentração de triazinas de 8 μg L⁻¹, tempo de extração 16 h, pH 5.5; volume de dessorção 200 μL MeOH, 60 min sob banho ultrassônico.

Tabela 27 - Precisões obtidas para o método BaμE(MIP) para as triazinas estudadas.

Triazinas	Níveis	Precisão intra-dias 1 (%)	Precisão intra-dia 2 (%)	Precisão inter-dia (%)
Ametrina	Baixo	10,3	6,5	8,8
	Médio	6,7	2,9	6,3
	Alto	2,0	1,4	2,9
Simazina	Baixo	9,3	2,3	17,4
	Médio	8,4	3,3	15,1
	Alto	2,4	2,8	11,9
Atrazina	Baixo	7,8	10,0	12,6
	Médio	4,0	2,5	3,0
	Alto	1,1	1,1	7,3
Terbutrina	Baixo	7,4	2,3	5,5
	Médio	2,8	4,1	4,9
	Alto	2,2	4,8	8,8

Baixo: 0,80 $\mu\text{g L}^{-1}$; Médio: 12,0 $\mu\text{g L}^{-1}$; Alto: 24,0 $\mu\text{g L}^{-1}$

Tabela 28 - Exatidões obtidas para o método BaμE(MIP) para as triazinas estudadas.

Triazinas	Níveis	Exatidão intra-dia 1 (RSD %)	Exatidão intra-dia 2 (RSD %)	Exatidão inter-dia (RSD %)
Ametrina	Baixo	8,4	13,1	11,3
	Médio	3,1	7,3	6,9
	Alto	1,4	2,1	3,0
Simazina	Baixo	2,2	9,2	17,1
	Médio	3,2	8,4	15,0
	Alto	3,0	2,4	11,9
Atrazina	Baixo	11,0	8,4	13,9
	Médio	2,6	4,1	3,1
	Alto	1,1	1,1	7,4
Terbutrina	Baixo	2,8	9,3	6,8
	Médio	4,5	3,1	5,4
	Alto	4,6	2,3	9,1

Baixo: 0,80 $\mu\text{g L}^{-1}$; Médio: 12,0 $\mu\text{g L}^{-1}$; Alto: 24,0 $\mu\text{g L}^{-1}$

Tabela 29 - Valores de efeito matriz do método BAμE(MIP) para as triazinas.

Sulfoniluréias	Efeito Matriz (%)
Ametrina	102,9
Simazina	87,4
Atrazina	91,8
Terbutrina	84,7

Figura 32 - Cromatograma obtido através da separação das triazinas empregando HPLC-DAD, AMT (1), SMZ (2), ATZ (3) , TER (4).

3.3 Método BAμE(MIP2) desenvolvido para as sulfoniluréias

Similarmente à otimização realizada para a classe das triazinas, as mesmas variáveis foram estudadas para as sulfoniluréias.

Primeiramente, avaliou-se o tipo de solvente e o tempo no banho ultrassônico, a fim de verificar o que possibilitaria uma melhor dessorção frente ao analitos e a fase sólida (MIP) na extração empregando a BAμE. Neste sentido, 200 μL de ACN, MeOH, misturas de ACN/MeOH, ACN/H₂O e MeOH/ H₂O (1:1, v/v) foram testados. A Figura 33a, demonstra o perfil obtido para os solventes testados, onde a ACN/H₂O, apresentou maior

eficiência na extração das sulfoniluréias na BA μ E, sendo escolhida para o processo de dessorção.

Em seguida, diferentes tempos no banho ultrassônico foram estudados, (15, 30, 45, 60 e 90 min). Conforme podemos observar, através da Figura 33b, a partir de 30 min é possível obter-se uma recuperação satisfatória para todos os analitos, sendo este o tempo escolhido para estudo.

Posteriormente, foram realizados ensaios de 750, 1000 e 1250 rpm, Figura 34a, sendo que 1000 rpm demonstrou uma melhor eficiência, como já discutido anteriormente.

Figura 33 - Recuperações médias obtidas: (a) no estudo do solvente para dessorção em meio aquoso; (b) no estudo do tempo para dessorção; Condições - extração: 25 mL ($8,0 \mu\text{g L}^{-1}$), 1000 rpm, 16 h, pH 5,5; μLD .

Figura 34 - Recuperações médias obtidas: (a) no estudo de velocidade de agitação; (b) no estudo de tempo de equilíbrio. Condições - extração: 25 mL ($8,0 \mu\text{g L}^{-1}$), 16 h, pH 5,5; μLD : 200 μL MeOH durante 60 min sob banho ultrassônico.

Figura 35 - Recuperações médias obtidas: (a) no estudo de pH; (b) adição NaCl; (c) adição MeOH. Condições extração: 25 mL ($8,0 \mu\text{g L}^{-1}$), 1000 rpm, 16 h, μLD : 200 μL MeOH durante 60 min sob tratamento ultrassônico.

O tempo de equilíbrio também foi estudado em ensaios de 1, 2, 3 e 16 h para os herbicidas. A Figura 34b, mostra o perfil obtido para os tempos de microextração estudados, verificando-se um aumento gradual na recuperação média, alcançando máxima eficiência em 16 h.

A Figura 35a, mostra o perfil de recuperações obtidas para o estudo do pH, que pode influenciar de forma positiva ou negativa para o processo de microextração. No entanto o pH 5,5 foi o escolhido, uma vez ter demonstrado melhor recuperação, prosseguindo-se para estudos posteriores.

O estudo da força iônica foi avaliado com adição de NaCl contendo percentagens de 0, 5, 10 e 15 % (m/v), onde verificou-se que não há vantagem na adição no processo de microextração, a qual é reduzida de forma gradativa com o aumento de adição do sal, (Figura 35b).

Por fim, avaliou-se a adição de MeOH, o qual elimina ou reduz o *wall-effect*. Assim, foram realizados ensaios com a adição de MeOH contendo percentagens de 0, 5,

10 e 15% (v/v) em água ultrapura, Figura 35c. Por observação do perfil de dados obtidos, verifica-se uma redução gradual na eficiência média para todos os analitos estudados.

Deste modo, para estudos posteriores, a metodologia proposta foi desenvolvida sem a adição de NaCl e MeOH.

3.4 Validação do método proposto para as sulfoniluréias

Após a otimização dos parâmetros que podem afetar o desempenho analítico da metodologia BA μ E(MIP2)- μ LD/HPLC-DAD, fixou-se as condições experimentais ótimas para prosseguir com a validação do método, usando as seguintes condições BA μ E(MIP2): 25 mL, 1000 rpm, 16 h, pH 5,5; μ LD: ACN:H₂O (1:1 v/v) 200 μ L, 30 min sob tratamento ultrassônico. O protocolo de validação para as triazinas, foi similar ao utilizado para a classe das sulfoniluréias, já descrito.

A linearidade do método (Figura 36) foi avaliada através da curva analítica em água ultrapura nas seguintes concentrações (2,0, 4,0, 8,0, 12,0, 16,0, 24,0 e 28 μ g L⁻¹). Construiu-se, também, curva empregando a na matriz de milho fortificada em níveis diferentes (0, 2,0, 8,0, 16,0 e 28,0 kg L⁻¹), conforme ilustrado na Figura 37. A faixa de quantificação analítica, os coeficientes de determinação, LDs e LQs linear para as sulfoniluréias estão apresentados na Tabela 30.

Figura 36 - Linearidade do método BaμE(MIP2) –μLD/HPLC-DAD determinada em água ultrapura.

Figura 37 - Linearidade do método BaμE(MIP2) –μLD/HPLC-DAD determinada em amostras de milho.

Tabela 30 - Dados obtidos das faixas de linearidade do método curva analítica BaμE(MIP2) para as sulfoniluréias estudadas.

Sulfoniluréias	Faixa Linear (μg L ⁻¹)	Coefficiente de determinação Água (r ²)	Coefficiente de determinação Milho (r ²)	LD (μg L ⁻¹)	LQ (μg L ⁻¹)
Thifensulfuron	2,0 – 28,0	0,9853	0,9915	0,40	1,3
Clorosulfuron	2,0 – 28,0	0,9971	0,9964	0,40	1,3
Tribenuron	2,0 – 28,0	0,9969	0,9929	0,40	1,3
Bensulfuron	2,0 – 28,0	0,9995	0,9950	0,40	1,3

Adicionalmente, para avaliar a linearidade da curva, foi feita a construção do gráfico de resíduos em relação à área relativa (eixo y da curva). (Figura 38)

Figura 38 - Gráfico de resíduos do método BaμE(MIP2)-μLD/HPLC-DAD.

O estudo de precisão intra-dia e inter-dias foi expresso em desvio padrão relativo (RSD %) sendo obtidos valores abaixo de 20% para o nível baixo (LOQ) e 15% para os demais níveis (Tabela 31). Os estudos de exatidão apresentaram valores aceitáveis, (abaixo de $\pm 20\%$) para o nível baixo (LOQ) e $\pm 15\%$ para os demais níveis (Tabela 32). E o estudo de efeito matriz também foram avaliados (Tabela 33), de acordo com Matuszewski (8). Esses valores de referência são empregados por alguns guias de validação e órgãos regulamentadores, como Resolução 899 da ANVISA ou com diretrizes da EU.

A Figura 39 apresenta os cromatogramas obtidos, após a extração de BA μ E tanto para MIP quanto para o NIP na análise de sulfoniluréias, evidenciando que durante a síntese os sítios ativos criados demonstraram uma maior afinidade pelas sulfonilúreias no MIP se comparado com o NIP. As condições experimentais foram: coluna C18 (150 mm x 4,6 mm, 2,6 μ m; Phenomenex), volume de injeção 20 μ L, temperatura do forno 30 °C, vazão 0,5 mL min⁻¹, proporção fase móvel (65:35) MeOH: H₂O com 0,1% ácido acético, concentração de sulfoniluréias de 8 μ g L⁻¹, tempo de extração 16 h, pH 5,5; volume de dessorção 200 μ L MeOH, 30 min sob banho ultrassônico.

Tabela 31- Precisoões obtidas para o método BA μ E(MIP2) para as sulfoniluréias estudadas.

Sulfoniluréias	Níveis	Precisão intra-dias 1° (RSD%)	Precisão intra-dia 2° (RSD%)	Precisão inter-dia (RSD %)
Thifensulfuron	Baixo	5,1	5,4	8,6
	Médio	7,5	3,8	6,4
	Alto	2,5	5,1	8,6
Clorosulfuron	Baixo	9,0	16,6	13,7
	Médio	6,2	4,6	5,0
	Alto	2,7	3,3	8,7
Tribenuron	Baixo	16,4	4,2	13,3
	Médio	7,6	11,9	9,7
	Alto	3,4	5,1	7,6
Bensulfuron	Baixo	7,1	9,9	10,2
	Médio	5,4	2,6	7,1
	Alto	5,1	2,5	8,1

Baixo: 2,0 μ g L⁻¹; Médio: 12,0 μ g L⁻¹; Alto: 24,0 μ g L⁻¹

Tabela 32 - Exatidões obtidas para o método BaμE(MIP2) para as sulfoniluréias estudadas.

Sulfoniluréias	Níveis	Exatidão intra-dia 1 (DPR %)	Exatidão intra-dia 2 (DPR %)	Exatidão inter-dia (DPR %)
Thifensulfuron	Baixo	8,4	13,1	11,3
	Médio	3,1	7,3	6,9
	Alto	1,4	2,1	3,0
Clorosulfuron	Baixo	2,2	9,2	17,1
	Médio	3,2	8,4	15,0
	Alto	3,0	2,4	11,9
Tribenuron	Baixo	11,0	8,4	13,9
	Médio	2,6	4,1	3,1
	Alto	1,1	1,1	7,4
Bensulfuron	Baixo	2,8	9,3	6,8
	Médio	4,5	3,1	5,4
	Alto	4,6	2,3	9,1

Baixo: 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$; Médio: 12,0 $\mu\text{g L}^{-1}$; Alto: 24,0 $\mu\text{g L}^{-1}$

Tabela 33 - Valores de efeito matriz do método BaμE(MIP2) para as sulfoniluréias.

Sulfoniluréias	Efeito Matriz (%)
Thifensulfuron	108,7
Clorosulfuron	98,1
Tribenuron	86,8
Bensulfuron	91,5

Figura 39 - Cromatograma obtido através da separação das sulfoniluréias empregando HPLC-DAD, thifensulfuron (1), clorosulfuron (2), tribenuron (3), bensulfuron (4).

3.5 Emprego de BAμE na análise de triazinas e sulfoniluréias em amostras de milho

Após o método ter sido desenvolvido, otimizado e validado, ele foi aplicado em 3 amostras de milho (9), obtidas em diferentes estabelecimentos, a fim de avaliar a aplicabilidade do método (Tabelas 34 e 35).

Em 15 g de milho moído adicionou-se 15 mL de acetonitrila. A mistura foi colocada em ultrassom por aproximadamente 60 minutos, seguida de uma filtração sob vácuo e dividida nos vials de extração; 1 mL da amostra foi adicionada a 24 mL de H₂O as quais foram enriquecidas com quantidades conhecidas de triazinas, seguida do processo de microextração BAμE e posterior análise por HPLC.

Realizou-se a injeção das amostras de milho, sendo que os herbicidas não foram detectados nas mesmas, demonstrando que os agricultores, estão em acordo, com os LMR exigido pela ANVISA, com isso, optou-se por fortificar as amostras em diferentes concentrações.

As condições utilizadas para avaliação do preparo da amostra no método foram: coluna C18 (150mm x 4,6 mm, 2,6 μm), volume de injeção 20 μL , temperatura do forno a 20°C, vazão 0,5 mL min^{-1} .

Como pode ser observada nas Tabelas 34 e 35, a exatidão do método foi adequada para todas as amostras de milho analisadas com base nos percentuais de recuperação entre (80,1 a 119,4%), tanto para as classe das triazinas quanto para a das sulfoniluréias (80,0 a 120,9%), demonstrando a aplicabilidade dos métodos desenvolvidos.

Tabela 34 - Recuperação de triazinas empregando BA μ E(MIP)- μ LD/HPLC-DAD.

Triazinas	Conc, $\mu\text{g kg}^{-1}$	Milho 1 (% $\pm$ RSD)	Milho 2 (% $\pm$ RSD)	Milho 3 (% $\pm$ RSD)
Ametrina	4,0	81,5 $\pm$ 7,2	80,5 $\pm$ 10,2	80,1 $\pm$ 6,4
	8,0	90,4 $\pm$ 8,5	86,8 $\pm$ 1,7	90,8 $\pm$ 3,6
	12,0	109,4 $\pm$ 6,4	93,3 $\pm$ 6,6	80,1 $\pm$ 2,8
	24,0	109,5 $\pm$ 2,9	119,4 $\pm$ 1,9	80,7 $\pm$ 1,4
Simazina	4,0	115,1 $\pm$ 10,1	85,2 $\pm$ 9,3	87,3 $\pm$ 3,1
	8,0	86,4 $\pm$ 7,5	86,5 $\pm$ 1,1	93,5 $\pm$ 3,2
	12,0	118,5 $\pm$ 3,8	101,0 $\pm$ 8,4	90,9 $\pm$ 2,7
	24,0	113,4 $\pm$ 3,6	108,1 $\pm$ 2,4	108,4 $\pm$ 2,2
Atrazina	4,0	116,2 $\pm$ 9,7	89,7 $\pm$ 7,7	81,0 $\pm$ 9,9
	8,0	84,7 $\pm$ 6,7	88,9 $\pm$ 3,9	90,9 $\pm$ 2,7
	12,0	117,6 $\pm$ 4,5	106,5 $\pm$ 4,0	97,3 $\pm$ 2,5
	24,0	108,1 $\pm$ 2,5	94,2 $\pm$ 1,1	108,3 $\pm$ 1,1
Terbutrina	4,0	117,2 $\pm$ 2,8	84,9 $\pm$ 7,4	83,7 $\pm$ 2,3
	8,0	89,8 $\pm$ 5,8	95,7 $\pm$ 3,9	81,7 $\pm$ 5,3
	12,0	99,3 $\pm$ 3,3	98,4 $\pm$ 2,8	96,4 $\pm$ 4,1
	24,0	96,0 ; 5,3	88,4 ; 2,2	101,8 ; 4,4

Tabela 35 - Recuperação de sulfoniluréias empregando BAμE(MIP2)-μLD/HPLC-DAD.

Sulfoniluréias	Conc, μg kg⁻¹	Milho 1 (% ± RSD)	Milho 2 (% ± RSD)	Milho 3 (% ± RSD)
Thifensulfuron	2,0	120,9 ± 1,8	111,1 ± 8,3	86,4 ± 13,4
	8,0	84,9 ± 9,7	98,4 ± 5,4	86,5 ± 3,4
	16,0	101,7 ± 6,4	100,4 ± 1,2	82,2 ± 9,6
	28,0	82,5 ± 2,5	87,3 ± 7,0	80,2 ± 8,5
Clorosulfuron	2,0	119,4 ± 6,8	112,2 ± 6,5	81,9 ± 9,6
	8,0	93,8 ± 5,8	106,9 ± 8,4	82,4 ± 6,9
	16,0	96,1 ± 4,9	100,4 ± 2,0	87,9 ± 10,7
	28,0	80,8 ± 4,6	80,6 ± 1,6	87,3 ± 8,7
Tribenuron	2,0	82,4 ± 6,8	120,3 ± 10,9	90,6 ± 12,1
	8,0	91,7 ± 4,9	115,9 ± 7,4	85,6 ± 3,2
	16,0	82,3 ± 3,1	92,1 ± 15,0	80,0 ± 9,0
	28,0	104,6 ± 3,3	97,2 ± 2,0	85,1 ± 7,6
Bensulfuron	2,0	112,8 ± 2,6	118,3 ± 9,2	88,7 ± 3,4
	8,0	91,8 ± 3,7	95,9 ± 12,9	100,8 ± 8,6
	16,0	89,5 ± 6,7	91,9 ± 7,3	83,8 ± 8,0
	28,0	82,3 ± 5,1	80,6 ± 7,9	91,8 ± 9,7

4 CONCLUSÃO

No presente estudo, foi proposta a metodologia BAμE, usando MIPs como material de sorção, tendo sido os métodos desenvolvidos, otimizados e validados para as duas diferentes classes de herbicidas estudados: triazinas e sulfoniluréias em amostras de milho. Nas condições experimentais otimizadas, obteve-se excelente desempenho analítico, incluindo boa eficiência, precisão adequada, limites analíticos ao nível de (μg kg⁻¹) e boa faixa linear.

O método BAμE, o qual opera sob tecnologia de amostragem por flutuação, demonstrou ser uma alternativa para a monitorização de baixos níveis de concentração de

triazinas e sulfoniluréias em amostras de milho, quando comparada a outras técnicas sortivas que operam no modo estático e apresentam menor eficiência.

A aplicação do método em matrizes de milho, mostrou ser de fácil execução, eficiente, obtendo-se boa seletividade, sensibilidade e bom desempenho analítico.

REFERÊNCIAS

- 1 ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J. M. F. Determination of steroid sex hormones in real matrices by bar adsorptive microextraction (BA μ E). **Talanta**, v. 136, p. 145–54, 2015.
- 2 NOGUEIRA, J. M. F. Stir-bar sorptive extraction – 15 years making sample preparation more environment friendly. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 214-223, 2015.
- 3 ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J. M. F. Determination of trace levels of parabens in real matrices by bar adsorptive microextraction using selective sorbent phases. **Journal of chromatography. A**, v. 1348, p. 17–26, 2014.
- 4 NENG, N. R. et al. Determination of mitragynine in urine matrices by bar adsorptive microextraction and HPLC analysis. **Talanta**, v. 144, p. 105–109, 2015.
- 5 NENG, N. R.; NOGUEIRA, J. M. F. Development of a bar adsorptive micro-extraction-large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometric method for pharmaceuticals and personal care products in environmental water matrices. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 402, n. 3, p. 1355–64, 2012.
- 6 AHMAD, S. M. et al. Application of bar adsorptive microextraction (BA μ E) for anti-doping control screening of anabolic steroids in urine matrices. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 969, p. 35–41, 2014f.
- 7 ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J. M. F. Comparison of the selectivity of different sorbent phases for bar adsorptive microextraction--application to trace level analysis of fungicides in real matrices. **Journal of chromatography. A**, v. 1265, p. 7–16, 2012.
- 8 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.
- 9 XU, S.; LI, J.; CHEN, L. Molecularly imprinted polymers by reversible addition-fragmentation chain transfer precipitation polymerization for preconcentration of atrazine in food matrices. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 282–9, 2011.

Capítulo 5

Conclusão Geral

A partir dos resultados referentes ao desenvolvimento e validação dos métodos analíticos desenvolvidos através das técnicas, BAμE e MEPS, foi possível ressaltar diferentes vantagens e particularidades de cada técnica. Ambas as técnicas se mostraram apropriadas para análise de resíduos de pesticidas em matrizes de milho. Os métodos desenvolvidos foram validados com sucesso demonstrando sua aplicabilidade no controle das classes estudadas, dentro de uma perspectiva da segurança alimentar. Na Tabela 36, estão apresentados os principais fatores divergentes e importantes em termos comparativos para as duas técnicas (o nível da vantagem é representado pelo maior número de estrelas).

Além dos parâmetros evidentes correlacionados aos preceitos da Química Verde, como menor consumo de solvente orgânico durante o processo de análise, as técnicas miniaturizadas desenvolvidas, apresentaram vantagens e desvantagens se comparadas entre si, e a sua escolha dependerá principalmente das características das amostras.

Tabela 36 - Comparação entre fatores de maior vantagem entre BAμE e MEPS.

	BAμE	MEPS
Consumo de solvente orgânico	★ ★ ★	★ ★ ★ ★
Tempo de análise	★	★ ★ ★
Consumo da amostra	★	★ ★ ★ ★ ★
Fator de pré-concentração	★ ★ ★ ★ ★	★
Consumo do sorvente	★ ★ ★ ★	★ ★ ★ ★
Possibilidade de reutilização	★	★ ★ ★ ★