AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**DEGRADAÇÃO DE PROFENOFÓS EM SOLUÇÃO AQUOSA E EM ERVILHAS
PROCESSADAS POR FEIXE DE ELÉTRONS E A SÍNTESE DE POLÍMEROS
IMPRESSOS PARA EXTRAÇÃO SELETIVA DESSE PESTICIDA**

Flávio Thihara Rodrigues

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Aplicações**

**Orientadora:
Profa. Dra. Anna Lucia Casañas Haasis
Villavicencio**

**Co-orientador:
Prof. Dr. Eric Marchioni**

**São Paulo
2015**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**DEGRADAÇÃO DE PROFENOFÓS EM SOLUÇÃO AQUOSA E EM ERVILHAS
PROCESSADAS POR FEIXE DE ELÉTRONS E A SÍNTESE DE POLÍMEROS
IMPRESSOS PARA EXTRAÇÃO SELETIVA DESSE PESTICIDA**

Flávio Thihara Rodrigues

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Aplicações**

Orientadora:
**Profa. Dra. Anna Lucia Casañas Haasis
Villavicencio**

Co-orientador:
Prof. Dr. Eric Marchioni

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2015

AGRADECIMENTOS

À Dra. Anna Lucia C. H. Villavicencio por todos os conselhos, ensinamentos, confiança e apoio.

Ao Dr. Eric Marchioni por ter me recebido junto à equipe de *Chimie Analytique des Molécules BioActives* (CAMBA) da Universidade de Strasbourg, contribuído para o desenvolvimento e estruturação deste trabalho.

À Dra. Diane Julien-David e Dra. Sonia Lordel por compartilhar conhecimento de química analítica, transmitir as instruções de manipulação dos equipamentos de cromatografia e realização da parte experimental deste trabalho.

Aos pesquisadores Dra. Céline Clayeux, Dr. Christophe Marcic, Dra. Françoise Bindler, Dra. Martine Bergaentzlé, Dra. Minjie Zhao, Dr. Saïd Ennahar pelo convívio harmonioso, por serem receptivos, esclarecerem dúvidas diversas, contribuições científicas e pessoais.

Ao Dr. Wilson Aparecido Parejo Calvo, Dra. Margarida Hamada e Dra. Mônica Beatriz Mathor pelo auxílio na resolução dos problemas do dia-a-dia e pelas palavras de incentivo.

À Aérial, principalmente ao Dr. Florentz Kuntz, Dr. Alan Strasser e Ludovic Frechard pela ajuda concedida e por disponibilizarem as instalações para a realização das irradiações.

À Ana Claudia Martinelli Feher, Claudia Regina Nolla, Marcos Cardoso da Silva e Myriam Benelhocine pela ajuda nos assuntos administrativos.

Ao Dr. Michel Mozeika Araújo, um grande amigo, que sempre esteve disposto a me ajudar e a solucionar qualquer dúvida científica.

Ao *Collège Doctoral Européen* (CDE) pela hospitalidade e pela excelente prestação de serviços.

Aos alunos de iniciação científica Hugues Zimmermann e Loic Bonne que me auxiliaram nas análises com polímeros impressos e compartilharam bons momentos em Strasbourg.

À Divisão de Ensino do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e ao Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) por terem ajudado a concretizar este trabalho.

À Universidade de São Paulo e à Universidade de Strasbourg por disponibilizarem as instalações físicas para realização desta pesquisa.

Aos colegas de trabalho da Universidade de Strasbourg M^e Mathieu Ostermann, Dr. Fernando Jonathan Lona Ramírez, M^a Ikram Hammi, Dr. Remmelt Van der Werf e Dra. Li Zhou.

Aos colegas do IPEN Dra. Amanda Cristina Koike, M^a Angélica Barbezan, Dr. Gustavo Bernardes Fanaro, Dr. Marcelo Augusto Gonçalves Bardi, Dra. Márcia Ribeiro, Dra. Patrícia Takinami e Dr. Renato Duarte.

Aos amigos que sempre me ajudaram distante ou próximos com conselhos e contribuições com este trabalho: Dra. Aniele Fischer Brand, Edmar Braga, M^a Daiane Cristine de Souza, Dr. Jeferson Moreto, Dra. Marlene Bampi, Dra. Milene Oliveira Pereira Bicudo, Dra. Gabrieli Alves de Oliveira e Oziel Hillmann.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Ciências sem Fronteiras pela bolsa de doutorado concedida, auxílio financeiro que permitiram o desenvolvimento desta tese e o estágio doutoral na Universidade de Strasbourg.

Ao Campus France e Égide por toda ajuda concedida em todos os processos de minha transição do Brasil para França.

A todos meus familiares, principalmente meus pais, Audenil Rodrigues Perez e Maruta Thihara Rodrigues, e minha irmã M^a Priscila Thihara Rodrigues, por me ensinar o sentido do amor puro e apoio incondicional em todos os momentos.

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, expresso minha sincera gratidão.

Agradeço a Deus, acima de tudo, que conduz minha vida.

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive”

Ricardo Reis
(Heterónimo de Fernando Pessoa)

*“Au début des recherches expérimentales
sur un sujet déterminé quelconque, l'imagination
doit donner des ailes à la pensée.
Au moment de conclure et d'interpréter
les faits que les observateurs ont
rassemblés, l'imagination doit, au contraire,
être dominée et asservie par les résultats
matériels des expériences”*

Louis Pasteur

DEGRADAÇÃO DE PROFENOFÓS EM SOLUÇÃO AQUOSA E EM ERVILHAS PROCESSADAS POR FEIXE DE ELÉTRONS E A SÍNTESE DE POLÍMEROS IMPRESSOS PARA EXTRAÇÃO SELETIVA DESSE PESTICIDA

Flávio Thihara Rodrigues

RESUMO

Profenofós é um organofosforado empregado como inseticida e acaricida amplamente utilizado no Brasil para o controle de pragas de cebolas, milho, soja, café, tomate, algodão, feijão, batata e outros. A irradiação é um processo empregado em todo o mundo e recomendada por diversos órgãos de saúde para a conservação de alimentos. A radiação ionizante utiliza raios gama, raios X ou aceleradores de elétrons e tem sido aplicada para eliminar ou reduzir a ação de agentes patogênicos e contribuir para aumentar o tempo de estocagem de vários alimentos. Os objetivos desse trabalho foram: (a) avaliar a degradação de soluções aquosas de profenofós submetidas à radiação ionizante, identificar e quantificar a formação de novos produtos por GC-MS; (b) analisar o efeito de feixe de elétrons em ervilhas inoculadas com soluções aquosas de profenofós; (c) sintetizar Polímeros Molecularmente Impressos (MIP) e Sílica Impressa Molecularmente (MIS), posteriormente, caracterizar os adsorventes em fase sólida e verificar sua seletividade para profenofós. O tratamento com aceleradores de elétrons com dose 31,6 kGy promoveu a formação de um novo produto de degradação e redução de 93,40 % de profenofós em soluções aquosas. Em ervilhas inoculadas com 1 µg de profenofós submetidas à radiação ionizante de 30,4 kGy promoveu uma redução na concentração de profenofós em 57,46 %. Além disso, foram realizadas sínteses de MIP e MIS para a extração em fase sólida de profenofós. Os MIS sintetizados por sol-gel mostraram-se eficazes para o reconhecimento molecular e extração seletiva de profenofós.

Palavras-chave: Profenofós, Irradiação de Alimentos, Ervilhas, Extração Líquido-Líquido, QuEChERS, Extração em Fase Sólida, Polímero de Impressão Molecular, Sílica Impressa Molecularmente

DEGRADATION OF PROFENOFOS IN AQUEOUS SOLUTION AND PEAS BY ELECTRON BEAM PROCESSED AND SYNTHESIS OF IMPRINTED POLYMERS FOR SELECTIVE EXTRACTION OF THIS PESTICIDE

Flávio Thihara Rodrigues

ABSTRACT

Profenofos is an organophosphate widely used in Brazil as insecticide and acaricide in the control of pests in onions, corn, soybeans, coffee, tomato, cotton, beans, potatoes among others. Irradiation is a process used worldwide and recommended by many health agencies for food preservation. Food irradiation preserving process uses accelerated electrons, gamma rays or X-rays. Ionizing radiation treatment is applied to eliminate or to reduce the action of pathogens and to increase the shelf life of some foods. The objective of this study were (a) to evaluate the degradation of aqueous solutions of Profenofos by ionizing radiation, identify and quantify the formation of new products by GC-MS; (b) to analyze the effects of electron beam in peas inoculated with aqueous solutions of Profenofos; (c) to synthesize Molecularly Imprinted Polymer (MIP) and Molecularly Imprinted Silica (MIS), subsequently characterize the adsorbents in solid phase and check its selectivity for profenofos. The treatment with electron accelerators with 31.6 kGy dose promoted the formation of a new by-product and 93.40 % reduction of profenofos in aqueous solutions. In peas inoculated with 1 µg of profenofos by ionizing radiation of 30.4 kGy promoted a reduction of 57.46 % in the concentration of profenofos. Furthermore, the MIP and MIS were performed for solid phase extraction of profenofos. The MIS synthesized by sol-gel proved to be effective for the recognition molecular and selective extraction of profenofos.

Keys words: Profenofos, Food Irradiation, Peas, Liquid-Liquid Extraction, Solid Phase Extraction, Quechers, Molecularly Imprinted Polymer, Molecularly Imprinted Silica

SUMÁRIO

	Página
CONTEXTO DA PESQUISA	18
OBJETIVOS	21
CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
1.1 Pesticidas.....	22
1.1.1 Destino e atuação dos pesticidas no meio ambiente	24
1.1.2 Classificação dos pesticidas	26
1.1.3 Organofosforados	27
1.1.3.1 Profenofós.....	29
1.2 Irradiação de Alimentos	31
1.2.1 Radiólise da água	33
1.2.2 Situação Sanitária de Alimentos Irradiados.....	34
1.2.3 Aceleradores de Elétrons	35
1.3 Métodos analíticos de extração.....	38
1.3.1 Extração em fase sólida.....	38
1.3.2 Metodologias de análise de resíduos de pesticidas em alimentos	39
1.3.3 Extração com solvente	40
1.3.4 QuEChERS	41
1.3.5 Síntese de polímeros de impressão molecular por via radicalar	43
1.3.5.1 Princípio da impressão molecular	43
1.3.5.2 Interações moleculares para preparo do MIP	44
1.3.5.3 Reagentes para síntese de MIPs	45
1.3.5.4 O estado da arte no preparo dos MIP	49
1.3.6 Síntese de moléculas impressas por via sol-gel	50
1.3.7 Caracterização do Suporte Impresso	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
 CAPÍTULO II - DEGRADAÇÃO DE PROFENOFÓS EM SOLUÇÃO AQUOSA POR FEIXE DE ELÉTRONS.....	 67
1. INTRODUÇÃO	68
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	70
2.1 Padrões e Reagentes	70

2.2 Métodos	70
2.2.1 Preparação das amostras	70
2.2.2 Irradiação	71
2.2.3 Procedimento de extração	71
2.2.4 Análise por GC-MS	72
2.2.5 Fator de resposta relativa e validação da metodologia	72
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
3.1 Degradação de profenofós.....	74
3.2 Degradação e subprodutos de profenofós formados após a uso da radiação ionizante.....	76
4. CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

CAPÍTULO III - DETERMINAÇÃO DE PROFENOFÓS EM ERVILHAS IRRADIADAS PROCESSADOS POR FEIXE DE ELÉTRONS UTILIZANDO O MÉTODO QuEChERS PARA EXTRAÇÃO DO AGROTÓXICO	87
1. INTRODUÇÃO	88
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	90
2.1 Amostras e Reagentes.....	90
2.2 Métodos	90
2.2.1 Preparação da Amostra	90
2.2.2 Irradiação	91
2.2.3 Moagem criogênica da ervilha e protocolo do método QuEChERS.....	91
2.2.4 Protocolo do método QuEChERS	93
2.3 Análise com GC-MS.....	96
2.4 Fator de resposta relativo e validação da metodologia	97
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
3.1 Método QuEChERS	99
3.2 Seleção do Padrão interno.....	100
3.3 Determinação cromatográfica usando GC-MS/MS	100
4. CONCLUSÃO	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105

CAPÍTULO IV - DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR PARA A EXTRAÇÃO SELETIVA DE PROFENOFÓS	108
1. INTRODUÇÃO	109
2. MATERIAL E MÉTODOS	111
2.1 Reagentes e materiais	111
2.2 Sínteses dos Polímeros de Impressão Molecular	111
2.3 Preparo da coluna SPE	114
2.4 Dessorção da molécula molde do polímero	115
2.5 Caracterização do perfil de eluição em SPE	115
2.5.1 Caracterização MIP I	116
2.5.2 Caracterização MIP II	116
2.5.3 Caracterização MIP III	117
2.5.4 Caracterização MIP IV	117
2.5.5 Caracterização MIP V	118
2.6 Validação do método	118
2.7 Método cromatográfico	119
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	120
3.1 Perfil cromatográfico do profenofós	120
3.2 Eliminação da molécula molde	120
3.3 Caracterização do MIP	121
3.3.1 Caracterização do MIP I	121
3.3.2 Caracterização do MIP II	122
3.3.3 Caracterização do MIP III	123
3.3.4 Caracterização do MIP IV com refrigeração	124
3.3.5 Caracterização MIP V	127
3.4 Análise dos MIP e seus constituintes	128
3.5 Validação da metodologia	129
4. CONCLUSÃO	132
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133

CAPÍTULO V - SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE SÍLICA IMPRESSA MOLECULARMENTE PARA A EXTRAÇÃO SELETIVA DE PROFENOFÓS	135
1. INTRODUÇÃO	136

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	138
2.1 Reagentes e solventes.....	138
2.2 Preparo da Sílica Impressa Molecularmente.....	138
2.3 Preparo da coluna MIS	141
2.4 Extração do profenofós do MIS antes do perfil de eluição	141
2.5 Procedimento geral de extração para MIS	141
2.5.1 Protocolo de extração para MIS I	142
2.5.2 Protocolo de extração para MIS II	142
2.5.3 Protocolo de extração para MIS III, IV e V	143
2.6 Método cromatográfico.....	143
2.7 Validação da metodologia analítica.....	144
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	145
3.1 Caracterização da solução de percolação	145
3.1.1 Caracterização do MIS I.....	145
3.1.2 Caracterização do MIS II.....	147
3.1.3 Caracterização do MIS III.....	153
3.1.4 Caracterização do MIS IV	154
3.1.5 Caracterização do MIS V	156
3.2 Análise dos MIS	157
3.3 Parâmetros analíticos da validação da metodologia	158
4. CONCLUSÃO	159
5. TRABALHOS FUTUROS	160
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	161

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1.1 - Produção agrícola e consumo de agrotóxicos nas lavouras do Brasil de 2002 à 2011.....	22
FIGURA 1.2 - Principais processos físicos, químicos, biológicos no transporte e na degradação de pesticidas no meio ambiente	25
FIGURA 1.3 - Estrutura molecular geral dos organofosforados	27
FIGURA 1.4 - Vias metabólicas sugeridas para degradação de profenofós no solo, vegetais e em reações enzimáticas	31
FIGURA 1.5 - Radura: símbolo internacional para alimentos irradiados	35
FIGURA 1.6 - Comportamento da deposição de energia em meio aquoso para diferentes energias cinéticas produzidas por aceleradores de elétrons	36
FIGURA 1.7 - Princípio de extração em fase sólida	38
FIGURA 1.8 - Alguns tipos de colunas de SPE	39
FIGURA 1.9 - Esquema da técnica de extração QuEChERS	42
FIGURA 1.10 - Polímero de molécula impressa	44
FIGURA 1.11 - Monômeros funcionais comumente empregados na síntese do MIP	46
FIGURA 1.12 - Estrutura química de alguns agentes de ligação cruzada usados na síntese de MIP	48
FIGURA 1.13 - Estrutura química dos iniciadores radicalares mais utilizadas na síntese de MIP	49
FIGURA 1.14 - Etapas do perfil de eluição envolvido no processo SPE	54
FIGURA 1.15 - Perfil ideal após o processo de extração realizado em polímeros impressos e não impressos, sendo P = Percolação, L = Lavagem e E = Eluição	55
FIGURA 2.1 - Fórmula molecular do profenofós	70
FIGURA 2.2 - Curva de degradação de profenofós na água purificada em função da dose de irradiação	75
FIGURA 2.3 - Cromatograma de solução profenofós irradiados com dose de 11,7 kGy (pico 3), padrão interno (pico 1) e produto de degradação (picos 2)	76

FIGURA 2.4.- Espectro de massa do obtido pela análise por GC-MS do profenofós com m/z de 339 [M] ⁺	77
FIGURA 2.5 - Espectro de massa correspondente ao subproduto de profenofós com m/z 259,1 obtido por irradiação	78
FIGURA 2.6 - Estrutura química da degradação potencial do principal subproduto de profenofós por acelerador de elétrons	79
FIGURA 2.7 - Produto de degradação profenofós em diferentes doses de irradiação	80
FIGURA 2.8 - Degradação de profenofós e subprodutos formados em diferentes doses de irradiação	80
FIGURA 2.9 - Adaptado de Zamy et. al (2004): Estruturas dos produtos de degradação do profenofós mediante irradiação policromática ($\lambda > 285$ nm) em solução aquosa. As Letras A, B, C, D,E e F indicam os diferentes caminhos, na qual ocorreram clivagem da molécula.....	82
FIGURA 3.1 - Frasco de polycarbonato, tampas e pêndulo de aço inoxidável.....	92
FIGURA 3.2 - Frasco de polycarbonato com vagens de ervilhas.....	92
FIGURA 3.3 - Freezer/Mill.....	92
FIGURA 3.4 - Coluna SPE - Carbon/NH ₂	94
FIGURA 3.5– Descrição esquemática do QuEChERS e o procedimento de <i>clean up</i> para ervilhas irradiadas.....	95
FIGURA 3.6 - Cromatograma do extrato de ervilhas irradiadas nas doses absorvidas de 4,5 kGy. Sendo o pico 1 o padrão interno e pico 2 o profenofós..	101
FIGURA 3.7 – Degradação de profenofós após a irradiação por feixe de elétrons analisados por GC-MS/MS em várias doses absorvidas. Barras de erros representam o valor do desvio padrão	103
FIGURA 4.1 - Síntese do MIP	114
FIGURA 4.2 – Cromatograma da solução de 2 µg/mL de profenofós diluído em água deionizada	120
FIGURA 4.3 - Perfil de eluição do MIP I obtido após C = 3 mL de H ₂ O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em diclorometano; L = 1 mL de ACN/MeOH (90/10, v/v); E1 e E2 = 1 mL de MeOH.....	122
FIGURA 4.4 (a, b e c) - Perfil de eluição do MIP III obtido após C = 3 mL de H ₂ O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H ₂ O; L1 = 1 mL de H ₂ O/ACN	

(80/20, v/v), L2 = 1 mL de H ₂ O/ACN (70/30, v/v); L3 = 1 mL de H ₂ O/ACN (60/40, v/v); E = 1 mL de ACN.....	124
FIGURA 4.5 (a, b e c) – Perfil de eluição do MIP IV obtido após C = 2 mL da solução aquosa com 1 % de ácido acético; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H ₂ O; L1, L2 e L3 = 1 mL de H ₂ O/ACN (60/40, v/v); E = 1 mL de ACN.....	125
FIGURA 4.6 (a, b e c) - Perfil de eluição do MIP IV obtido após C = 3 mL de H ₂ O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H ₂ O; L1 = 1 mL de MeOH/H ₂ O (40/60, v/v), L2 = 1 mL de MeOH/H ₂ O (30/70, v/v); L3 = 1 mL de MeOH/H ₂ O (20/80, v/v); E = 1 mL de MeOH.....	126
FIGURA 4.7 – Perfil de eluição do MIP V obtido após C = 3 mL de H ₂ O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H ₂ O; L1 = 1 mL de MeOH/H ₂ O (40/60, v/v), L2 = 1 mL de MeOH/H ₂ O (30/70, v/v); L3 = 1 mL de MeOH/H ₂ O (20/80, v/v); E = 1 mL de MeOH.....	127
FIGURA 4.8 (a, b e c) – Perfil de eluição do MIS V obtido após C = 3 mL de H ₂ O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H ₂ O; E1, E2 e E3 = 1 mL de MeOH.....	128
FIGURA 5.1 – Esquema da produção do MIS e do NIS.....	140
Figura 5.2 - Perfil de eluição do MIS I obtido após C = 5 mL de H ₂ O; P = 1 mL de H ₂ O com 2 µg/mL de profenofós; L1 e L2 = 1 mL de H ₂ O/ACN (60/40, v/v) e L3 = 500 µL de H ₂ O/ACN (60/40, v/v); E1 e E2 = 1 mL de ACN.....	145
Figura 5.3 - Perfil de eluição do MIS I obtido após C = 5 mL de H ₂ O; P = 1 mL de H ₂ O com 2 µg/mL de profenofós; L1 e L2 = 1 mL de H ₂ O/ACN (60/40, v/v) e L3 = 500 µL de H ₂ O/ACN (60/40, v/v); E = 1 mL de ACN.....	146
Figura 5.4 - Perfil de eluição do MIS I obtido após C = 5 mL de H ₂ O; P = 1 mL de H ₂ O com 2 µg/mL de profenofós; L1 e L2 = 1 mL de H ₂ O/ACN (60/40, v/v) e L3 = 500 µL de H ₂ O/ACN (60/40, v/v); E1 e E2 = 1 mL de ACN.....	146
FIGURA 5.5 – Perfil de eluição do MIS I obtido após C = 5 mL de H ₂ O; P = 1 mL de H ₂ O com 2 µg/mL de profenofós; L1 e L2 = 1 mL de H ₂ O/ACN (60/40, v/v) e L3 = 500 µL de H ₂ O/ACN (60/40, v/v); E1 e E2 = 1 mL de ACN.....	147
FIGURA 5.6 - Perfil de eluição do MIS II.A (catucho I) obtido após C = 10 mL de H ₂ O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H ₂ O, L1 e L2 = 1 mL de H ₂ O/ACN (60/40, v/v) e L3 = 500 µL de H ₂ O/ACN (60/40, v/v); E1, E2, E3 e E4 = 1 mL de ACN.....	148

FIGURA 5.7 - Perfil de eluição do MIS II.A (cartucho II) obtido após C = 10 mL de H ₂ O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H ₂ O; L1 e L2= 1 mL de H ₂ O/ACN (80/20, v/v) e L3 = 500 µL de H ₂ O/ACN (80/20, v/v); E1, E2, E3 e E4 = 1 mL de ACN.....	149
FIGURA 5.8 - Perfil de eluição do MIS II.B obtido após C = 10 mL de H ₂ O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H ₂ O; L1, L2 e L3 = 1 mL de H ₂ O/ACN (80/20, v/v) e L3 = 500 µL de H ₂ O/ACN (80/20, v/v); E1, E2, E3 e E4 = 1 mL de ACN.....	149
FIGURA 5.9 - Perfil de eluição do MIS II.C obtido após C = 10 mL de H ₂ O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H ₂ O; L1 e L2 = 1 mL de H ₂ O/ACN (80/20, v/v) e L3 = 500 µL de H ₂ O/ACN (80/20, v/v); E1, E2, E3 e E4 = 1 mL de ACN.....	150
FIGURA 5.10 – Perfil de eluição do MIS II.A obtido após C = 5 mL de ACN; 5 mL de MeOH e 5 mL de H ₂ O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H ₂ O; L1, L2, L3 e L4 = 1 mL de H ₂ O/MeOH (60/40, v/v), L5 = 0,5 mL de H ₂ O/MeOH (60/40, v/v); E1, E2 e E3 = 1 mL de ACN.....	151
FIGURA 5.11 - Perfil de eluição do MIS II.B obtido após C = 5 mL de ACN; 5 mL de MeOH e 5 mL de H ₂ O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H ₂ O; L1, L2, L3 e L4 = 1 mL de H ₂ O/MeOH (60/40, v/v), L5 = 0,5 mL de H ₂ O/MeOH (60/40, v/v); E1, E2 e E3 = 1 mL de ACN.....	152
FIGURA 5.12 - Perfil de eluição do MIS III.C obtido após C = 5 mL de ACN; 5 mL de MeOH e 5 mL de H ₂ O, P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H ₂ O; L1, L2, L3 e L4 = 1 mL de H ₂ O/MeOH (60/40, v/v), L5 = 0,5 mL de H ₂ O/MeOH (60/40, v/v); E1, E2 e E3 = 1 mL de ACN.....	152
FIGURA 5.13 - Perfil de eluição do MIS III obtido após C = 5 mL de H ₂ O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H ₂ O; L1, L2 e L3 = 1 mL de H ₂ O/ACN (80/20, v/v); E1, E2, E3 e E4 = 1 mL de ACN.....	153
FIGURA 5.14 - Perfil de eluição do MIS IV obtido após C = 5 mL de H ₂ O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H ₂ O; L1, L2 e L3 = 1 mL de H ₂ O/ACN (80/20, v/v); E1, E2, E3 e E4 = 1 mL de ACN.....	154
FIGURAS 5.15 - Perfil de eluição do MIS IV obtido após C = 5 mL de H ₂ O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H ₂ O; L1, L2 e L3 = 1 mL de H ₂ O/ACN (75/25, v/v); E1, E2, E3 e E4 = 1 mL de ACN.....	155

FIGURA 5.16 - Perfil de eluição do MIS IV obtido após C = 5 mL de H₂O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H₂O; L1, L2 e L3 = 1 mL de H₂O/ACN (75/25, v/v), L4 e L5 = 500 µL de H₂O/ACN (75/25, v/v); E1, E2, E3 e E4 = 1 mL de ACN.....156

FIGURA 5.17 - Perfil de eluição do MIS V obtido após C = 5 mL de H₂O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H₂O; L1, L2 e L3 = 1 mL de H₂O/ACN (80/20, v/v); E1, E2, E3 e E4 = 1 mL de ACN.....157

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1.1 - Classes toxicológicas dos pesticidas.....	26
TABELA 1.2 - Culturas e tolerância para profenofós.....	30
TABELA 2.1 - Valores de peso molecular (Mw), fatores relativos de resposta (RRF), tempos de retenção (Tr) de profenofós e atrazina.....	75
TABELA 2.2 - Parâmetros analíticos de cromatografia gasosa para profenofós...	76
TABELA 3.1 - Condições de detecção por GC-MS/MS: tempo de retenção, fatores de resposta relativos (RRF), tempos de retenção (Tr) da atrazina e do profenofós.....	101
TABELA 3.2 - Linearidade e limite de detecção do profenofós em ervilhas.....	102
TABELA 3.3 - Eficiência de remoção de profenofós por feixe de elétrons.....	102
TABELA 4.1 - Sínteses de polimerização radicalar.....	112
TABELA 4.2 - Diferentes soluções aquosas (com ACN e MeOH) de profenofós obtidas por HPLC-UV.....	130
TABELA 4.3 - Parâmetros analíticos de cromatografia gasosa para profenofós.....	131
TABELA 5.1 - Sínteses de polimerização via sol-gel.....	139
TABELA 5.2 - Parâmetros analíticos de HPLC-UV para profenofós.....	158

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrila

AIBN: 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila

APTES: 3-aminopropiltrietoxisilano

DVB: divinilbenzeno

CG: Cromatografia Gasosa

EGDMA: Etileno Glicol Dimetacrilato

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

GC: Cromatografia Gasosa

LoD: Limite de Detecção (*Limit of Detection*)

LoQ: Limite de Quantificação (*Limit of Quantitation*)

MIP: Polímero de Impressão Molecular (*Molecularly Imprinted Polymer*)

MIS: Polímero de Sílica Impressa Molecularmente (*Molecularly Imprinted Sílica*)

MAA: Ácido Metacrílico

MeOH: Metanol

MS: Espectro de Massa

NIP: Polímero Não Impresso (*Non-Imprinted Polymer*)

NIS: Polímero de Sílica Não Impressa Molecularmente (*Non-Imprinted Silica*)

PTMS: Feniltrimetoxisilano

RRF: Fator de Resposta Relativo (*Relative Response Factor*)

SIM: Monitoramento de Íons Seleccionados (*Selected Ion Monitoring*)

SPE: Extração em Fase Sólida (*Solid Phase Extraction*)

UV: Ultravioleta

TeOS: Tetraetoxisilano

t_R : Tempo de Retenção

CONTEXTO DA PESQUISA

O emprego de pesticidas nas lavouras para obter alimentos mais resistentes ao ataque de pragas tornou-se uma ferramenta essencial para garantir o desenvolvimento e a expansão da produção agrícola. Contudo, o uso incorreto de pesticidas na agricultura pode ocasionar o desequilíbrio ambiental, contaminação dos aquíferos, deposição de resíduos e metais pesados no solo, prejudicar a saúde do trabalhador rural, contaminação dos produtos alimentícios e a intoxicação humana ocasionada pela ingestão destes alimentos contaminados.

Como alternativa de evitar perdas de pós-colheitas, garantir uma maior qualidade nos alimentos, a irradiação pode ser empregada em diversas hortaliças, frutas e vegetais. A aplicação da radiação ionizante em alimentos corrobora para garantir a manutenção das qualidades sensoriais, a sua salubridade, reduzir as perdas naturais causadas por processos fisiológicos (como brotamento, maturação e envelhecimento) e reduzir a carga microbiológica, entre outros benefícios. A irradiação de alimentos é uma tecnologia segura, podendo substituir ou ser utilizada de forma conjugada com os outros processos químicos, térmicos, físicos de conservação de alimentos.

Para identificar e quantificar os pesticidas presente em alimentos existem diversos métodos de preparo de amostras como a extração líquido-líquido, extração em fase sólida (SPE – *Solid Phase Extration*), ambos métodos são rápidos, flexíveis de fácil manipulação que pode ser empregado para separar e isolar um ou mais analitos presentes numa mistura líquida ou extrato de uma mistura sólida, empregadas na purificação, pré-concentração de resíduos de pesticidas e aplicados para diversas matrizes. Outros métodos empregados nesse trabalho foram o QuEChERS e os polímeros impressos molecularmente para extração do profenofós.

A metodologia QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) é um método de extração de pesticidas para determinação de componentes multirresiduais e eliminar interferentes provenientes da matriz.

Os Polímeros Molecularmente Impressos (*Molecularly Imprinted Polymers* – MIP) e Sílica Impressa Molecularmente (*Molecularly Imprinted Silica* - MIS) são polímeros sintéticos, com capacidade de reconhecer seletivamente uma molécula específica, fornecidos por um molde. O reconhecimento molecular pode ser caracterizado como a ligação preferencial de um composto a um receptor com alta seletividade sobre outros.

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho consistiram em:

- (a) Avaliar a degradação de soluções aquosas de profenofós submetidas à radiação ionizante, identificar e quantificar a formação de novas moléculas resultantes dessa interação;
- (b) Analisar o efeito de feixe de elétrons em ervilhas inoculadas com soluções aquosas de profenofós. Além de extrair o pesticida com método QuEChERS para sua identificação e quantificação por cromatografia à gás acoplada à espectrometria de massas operando no modo *tandem* (GC-MS/MS);
- (c) Sintetizar Polímeros Molecularmente Impressos (MIP) e Sílica Impressa Molecularmente (MIS), posteriormente, caracterizar os adsorventes em fase sólida para a extração e verificar sua seletividade para o profenofós.

CAPÍTULO I

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Pesticidas

Nas últimas décadas, o aumento surpreendente da produção agrícola, batizado de Revolução Verde, tem como resultado o emprego de pesticidas sintéticos no controle de ervas daninhas e insetos (Shibamoto e Bjeldanes, 2014), visando a produção extensiva de *commodities* agrícolas (MAA, 2015).

O Ministério do Desenvolvimento Agrário (MDA, 2012) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013) mostraram que o Brasil é o maior consumidor e produtor de agrotóxicos do mundo, desde o ano de 2009. A utilização de pesticidas na agricultura brasileira tem apresentado um crescimento significativo (FIG. 1.1), sendo que o consumo médio passou 10,5 litros por hectare (l/ha) em 2002, para 12,0 l/ha em 2011.

FIGURA 1.1 – Produção agrícola e consumo de agrotóxicos nas lavouras do Brasil de 2002 à 2011

Fonte – Adapato de SINDAG (2010 e 2011) e IBGE/SIDRA (2012)

Segundo Ministério do Meio Ambiente (MMA) (2015) os pesticidas são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, utilizados nos setores de produção, colheita, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas de alimentos, pastagens, proteção de florestas (nativas ou plantadas) e de outros ecossistemas (ambientes urbanos, hídricos e industriais), com a finalidade de alterar a composição da flora ou da fauna, para preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. Ainda, os agrotóxicos são definidos como substâncias e produtos químicos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento, bioativos capazes de prevenir, destruir ou combater espécies indesejáveis que interfere na produção de alimentos (Holland, 2006).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2015) fiscaliza a qualidade e a eficácia dos agrotóxicos usados no Brasil e ao mesmo tempo, diminuir o risco que a aplicação desses produtos possa oferecer à saúde humana e ao meio ambiente. O agrotóxico precisa ser registrado pelo MAPA, pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e pela ANVISA.

Na Europa, a *European Food Safety Authority* (EFSA, 2015) é o órgão responsável por fiscalizar os riscos dos pesticidas e o *Annual Report on pesticides Residues* analisa e avalia as informações dos compostos químicos aplicados na agricultura. A legislação da União Europeia (UE) referente aos pesticidas disponíveis ao agricultor, encontra-se descrita na Directiva 91/414/CEE, do Decreto de Lei nº 98/94, que tem como finalidade assegurar a harmonização da homologação dos pesticidas utilizados na lavoura, reavaliar e regulamentar os agrotóxicos existentes, autorizar o emprego de novos produtos no campo e reduzir os riscos de contaminação (Amaro, 2007).

A concentração máxima permitida ou reconhecida como admissível em um alimento é denominada como Limite Máximo de Resíduos – (LMR) (Cooper e Dobson, 2007; Payá et al., 2007). O LMR visa estabelecer um controle da exposição humana aos resíduos de pesticidas presentes nos alimentos (ANVISA, 2003; Škrbić e Predojević, 2008).

No Brasil, a ANVISA criou em 2001 o Programa Nacional de Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Os principais objetivos do PARA são detectar resíduos devido ao uso impróprio e/ou uso não

autorizado do agrotóxico para determinada cultura, avaliar a segurança para o consumo do alimento tratado, proteger a credibilidade de exportadores perante seus clientes e melhorar ações contra o uso impróprio destes produtos (ANVISA, 2001).

O controle de resíduos e contaminantes exerce papel fundamental para garantir a segurança alimentar. É por meio do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) que o MAPA (2011) assegura que os produtos alimentícios que chegam ao consumidor livres de substâncias perigosas e contaminantes a níveis não aceitáveis.

1.1.1 Destino e atuação dos pesticidas no meio ambiente

Os pesticidas têm sido empregados de diversos modos durante a pré e a pós-colheita dos alimentos. Infelizmente, alguns pesticidas, como DDT (Dicloro-difenil-tricloroetano), persistem e permanecem na natureza e, conseqüentemente, são encontrados em vários alimentos cultivados em solo contaminado ou nos peixes que vivem em água contaminada (Shibamoto e Bjeldanes, 2014).

Os problemas ambientais ocasionados pelo uso incorreto de pesticidas estão relacionados principalmente com o destino que estes compostos tem no meio ambiente, como a contaminação de solos agrícolas, de águas superficiais e subterrâneas, na atmosfera e nos alimentos (Cooper e Dobson, 2007; Payá et al., 2007). Os pesticidas em contato com o solo estão vulneráveis aos processos físico-químicos que controlam seu destino no ambiente, como processo de adsorção, sorção ou retenção, transformações de natureza biológica (degradação por microorganismos) ou química (quebra da molécula por fotólise ou hidrólise). A biodegradação pode ser considerada o principal mecanismo de degradação dos agrotóxicos no solo, devido a ação microbiana nas moléculas dos pesticidas (Baskaran et al., 2003).

Os pesticidas podem ser transportados no ecossistema pelos processos de lixiviação, volatilização e escoamento superficial (*run-off*) ocorrendo exposição dos recursos hídricos ao risco de contaminação. Na FIG.1.2 estão representados, esquematicamente, os principais processos na degradação e movimentação dos pesticidas na natureza e ainda ilustra os caminhos mais prováveis nos quais esses produtos químicos podem ser encontrados (Birolli, 2013).

FIGURA 1.2 - Principais processos físicos, químicos, biológicos no transporte e na degradação de pesticidas no meio ambiente

Fonte – Adaptado de Birolli (2013)

No processo de degradação dos pesticidas deve se considerar os processos químicos, físicos e biológicos, como também seus produtos de degradação. Além de haver a degradação físico-química do pesticida no solo, ocorre a ação enzimática da biota do solo, dificultando a separação do produto degradado biologicamente com o composto modificado abioticamente, como ocorre em grupos funcionais lábeis ou interconvertidos (Birolli, 2013).

1.1.2 Classificação dos pesticidas

O Brasil é um dos países que mais utilizam pesticidas no mundo com 425 princípios ativos permitidos para uso agrícola e 2 mil formulações comerciais diferentes (ANVISA, 2014). Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com sua toxicologia, sua ação e ao grupo químico a que pertencem (Patnaik, 2007).

Os pesticidas estão divididos em quatro classes toxicológicas (TAB 1.1), Dose Letal (DL₅₀), que são: I = rótulo vermelho, II = rótulo amarelo, III = rótulo azul e IV = rótulo verde. A classe I abrange os compostos considerados altamente tóxicos para seres humanos, a II, os medianamente tóxicos, a III, os pouco tóxicos e a IV, os compostos considerados praticamente não-tóxicos para seres humanos (IAL, 2008).

TABELA 1.1 - Classes toxicológicas dos pesticidas

Classe	Toxicidade	DL ₅₀ oral (mg/kg)		DL ₅₀ dérmica (mg/kg)		CL ₅₀ inalatória (mg/L)
		Líquido	Sólido	Líquido	Sólido	
I	Extremamente	≤ 20	≤ 5	≤ 40	≤ 10	≤ 0,2
II	Altamente	20 - 200	5 – 50	40 – 400	10 – 100	0,2 – 2,0
III	Medianamente	200 - 2000	50 – 500	400 - 4000	100 - 1000	2,0 - 20,0
IV	Pouco tóxico	> 2000	> 500	> 4000	> 1000	> 20,0

DL: Dose letal; CL: Concentração Letal

Fonte – Adaptado de EMBRAPA (2006)

A Dose Letal considera a quantidade da substância tóxica que produz uma mortalidade de 50 % dos animais de prova em condições controladas por 24 horas. Esta dose geralmente é expressa em função da massa do agente tóxico inoculada (mg) por unidade de massa corpórea da espécie em estudo (kg) (EMBRAPA, 2006).

Os agrotóxicos são agrupados conforme o tipo de agente a ser controlado e podem ser classificados como inseticidas, fungicidas, herbicidas, bactericidas, acaricidas, nematocidas, moluscidas e raticidas (Carvalho, 2009; Jickells e Negrusz, 2008; Patnaik, 2007). Segundo SINDAG (2010), os agrotóxicos mais utilizados no Brasil são os herbicidas seguidos pelos inseticidas e fungicidas.

Quanto à forma de atuação, os pesticidas podem ser sistêmicos ou não-sistêmicos (Carvalho, 2009). Os sistêmicos fixam-se na superfície da planta, dispersando-se, subsequentemente, através de toda a planta, transportando-se em quantidade letal para o inseto, sem prejudicar a planta. Os não-sistêmicos necessitam atingir diretamente os organismos nocivos para serem eficazes, portanto, tem ação de contato, penetração, ingestão e fumigante. Com relação à toxicologia dos alimentos as classes mais importantes de pesticidas são os inseticidas, os fungicidas e os herbicidas. Os acaricidas, os moluscicidas e os rodenticidas têm menor importância (Shibamoto e Bjeldanes, 2014).

Do ponto de vista da composição química, os pesticidas possuem uma grande diversidade estrutural, mas muitos deles apresentam algumas características em comum, sendo classificados dentro de um mesmo grupo, ou seja, por estruturas moleculares semelhantes. Os pesticidas podem ser divididos quimicamente em quatro classes distintas: organoclorados, organofosforados, piretróides e carbamatos (Ware e Whitane, 2004; U.S. EPA, 2012).

As próximas seções abordam a descrição do pesticida organofosforado e profenofós que foram empregados nos experimentos realizados neste trabalho.

1.1.3 Organofosforados

Os organofosforados são compostos que atuam como inseticidas ou acaricidas formados por éteres ou tióis derivados de ácidos fosfóricos, fosfônico, fosfínico ou fosforamídico (Grisolia, 2005), estão entre os pesticidas sintéticos mais antigos, que compõe a classe de inseticidas mais utilizados na atualidade. Sua estrutura molecular está descrita na FIG. 1.3.

FIGURA 1.3 - Estrutura molecular geral dos organofosforados

Sendo: X = O, S ou SE, o R₁ e R₂ = alquil, SR', OR' ou NHR' e o L = Halogênios, alquil, aril ou compostos heterocíclicos

Os R_1 e R_2 são grupos arilas ou alquilas, formando fosfinatos ou fosfonatos ou tiofosfonatos, através de um átomo de oxigênio ou de enxofre, formando fosfatos e fosforotioatos. Em algumas situações, R_1 está diretamente ligado ao átomo de fósforo e o R_2 está ligado por um átomo de oxigênio ou de enxofre, formando fosfonatos ou tiofosfonatos. O grupo L pode pertencer a uma variedade de grupos, tais como halogênios, alquila, arila ou heterocíclicos (Santos et al., 2007).

A classe dos organofosforados ocupam um terço dos pesticidas mais utilizados mundialmente por proporcionar alto rendimento na produção agrícola, possuir baixo custo (Kanekar et al., 2004; Singh e Walker, 2006; Cycon et al., 2009) e ter ampla gama de aplicação (Xu et al., 2010). Os principais pesticidas organofosforados são: paration, metil parathion, metilparaoxon, paraoxon, diaziona, melation (Shibamoto e Bjeldanes, 2014) e profenofós.

Até recentemente, pouca atenção foi dada aos possíveis efeitos tóxicos dos pesticidas sobre os organismos alvo, os seres humanos e outros organismos (Shibamoto e Bjeldanes, 2014). O uso intensivo de organofosforados leva a contaminação do meio ambiente pelo processo de escoamento superficial no solo e a lixiviação das águas subterrâneas. Além de intoxicar diretamente os agricultores eles ainda podem ampliar o seu processo de contaminação até as populações dos grandes centros urbanos.

A maioria dos compostos desta classe são inibidores da acetilcolinesterases como a acetilcolina (ACh), que é um neurotransmissor (Grisola, 2005) responsável pelo funcionamento do sistema nervoso, bem como em certas regiões cerebrais, permitindo a transmissão de impulsos nervosos nos seres vivos (Shibamoto e Bjeldanes, 2014).

Normalmente, acetilcolina após ser liberada, se degrada rapidamente por enzimas conhecidas como colinesterases. Os organofosforados são capazes de competir com a acetilcolina pelo sítio receptor localizado nas colinesterases e, dessa forma, bloqueiam a quebra da acetilcolina. A extensão da inibição da enzima depende muito de fatores estéricos, isto é, do modo como o inibidor se encaixa na enzima e também da natureza dos grupos orgânicos presentes.

O acúmulo resultante de acetilcolina nas junções da musculatura lisa em humanos provoca uma opressão torácica, salivação, lacrimejamento, aumento da sudorese, peristalse, náuseas, vômitos, cólicas, diarreia, bradicardia e uma

constrição característica das pupilas oculares (Grisolia, 2005; Shibamoto e Bjeldanes, 2014).

Embora os organofosforados representem um perigo ocupacional significativo para os trabalhadores agrícolas, os resíduos presentes nos produtos alimentícios normalmente não acarretam exposições suficientes para provocar sintomas tóxicos agudos em seres humanos (Shibamoto e Bjeldanes, 2014).

1.1.3.1 Profenofós

O profenofós é classificado como pesticida organofosforado, apresenta nome químico de O-4-bromo-2-chlorophenyl O-ethyl S-propyl, fórmula química: $C_{11}H_{15}BrClO_3PS$ (FAO, 1998; ANVISA, 2012; Reddy e Rao, 2008), possui ação acaricida e inseticida. Este pesticida é aplicado na estrutura foliar nas culturas de algodão, amendoim, batata, café, cebola, ervilha, feijão, feijão-vagem, girassol, mandioca, melancia, milho, pepino, repolho, soja, tomate e trigo na agricultura brasileira (ANVISA, 2012). O profenofós é amplamente utilizado em vários países, como a Tailândia, Vietnã e Índia (Swarnam e Velmurugan 2013; Toan et al. 2013), incluindo o Brasil (AGROFIT, 2015).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a molécula de profenofós possui toxicidade moderada (Classe toxicológica II) em contato dérmico ou injeção do produto (Malghani et al., 2009).

A TAB. 1.2 apresenta as diferentes culturas agrícolas e sua respectiva tolerância para o profenofós, de acordo com o MAPA. Os ingredientes ativos, produtos formulados, relatórios e componentes de fórmulas registrados no MAPA, podem ser consultados no Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT, 2015).

TABELA 1.2 - Culturas e tolerância para profenofós

Cultura (s)	Limite Máximo de Resíduo mg/kg do Produto Comercial		Intervalo de Seguraça (Dias)	Ingestão Diária (IDA) mg/kg Peso Corporal
	Nacional	Codex		
Amendoim	0,02	-	22	0,01
Batata	0,05	0,05	14	0,01
Café	0,03	-	7	0,01
Cebola	0,05	-	5	0,01
Ervilha	0,10	-	4	0,01
Feijão	0,10	-	14	0,01
Melancia	0,05	-	4	0,01
Milho	0,02	-	7	0,01
Pepino	0,10	-	3	0,01
Repolho	0,05	1,00	14	0,01
Soja	0,10	0,05	21	0,01
Tomate	1,00	10,00	10	0,01
Trigo	0,10	-	14	0,01

Segundo, dados da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* - Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas) o profenofós pode ser efemeramente degradado em condições aeróbias até a mineralização do pesticida. O principal composto químico resultado da hidrólise ou das reações metabólicas do profenofós é definido como 4-bromo-2-clorofenol. A FIG. 1.4 esquematiza os diversos produtos de degradação por biotransformações possíveis para o profenofós (Silva, 2013).

FIGURA 1.4 - Vias metabólicas sugeridas para degradação de profenofós no solo, vegetais e em reações enzimáticas

1.2 Irradiação de Alimentos

A irradiação de alimentos é empregada como método de conservação segura, com a finalidade de reduzir a incidência de doenças alimentares e problemas potenciais na cadeia de produção de alimentos (Lima et al., 2001; Miller, 2005).

A radiação ionizante apresenta várias vantagens em relação aos métodos tradicionais de conservação de alimentos (Farkas, 2006) por atuar como um tratamento fitossanitário no controle de pragas (Morehouse, 2002), proporcionar aumento da vida de prateleira de alguns produtos alimentícios, reduzir os níveis de contaminação microbiológica e retardar os processos fisiológicos em vegetais (Lima et al., 2001).

O processo de irradiação de alimentos é um tratamento físico pelo qual ocorre a emissão e propagação de energia através do espaço ou de uma matéria. Os equipamentos emissores de radiação ionizante podem ser classificados como

fontes naturais ou artificiais. Fontes emissoras naturais consistem em um radioisótopo emissor alfa (α), beta (β) ou gama (γ) de alta energia. As fontes artificiais geram feixe de elétrons de energias variáveis, e incluem equipamentos de raios X, aceleradores de elétrons e cíclotrons (Fellows, 2006).

Para aplicações em alimentos, as principais fontes emissoras de raios gama são: cobalto-60 (^{60}Co) ou cézio-137 (^{137}Cs). Os raios X gerados por máquinas que operam com nível de energia de até 5 MeV e os feixe de elétrons gerados por máquinas que operam com nível de energia de até 10 MeV, também são permitidos para utilização em alimentos segundo o *Codex Alimentarius Commission* (CAC, 2003).

A irradiação é normalmente aplicada em alimentos embalados, processo de fácil controle e os produtos podem ser imediatamente distribuídos na cadeia de abastecimento alimentar após o tratamento (Roberts, 2014). Os custos do tratamento de irradiação de alimentos são competitivos com tratamentos alternativos e em alguns casos pode ser considerada menos dispendiosa (Boaratti, 2004). Contudo, o processo ionizante não evita a re-contaminação ou a re-infestação de agentes patogênicos (Boaratti, 2004).

Alimentos que apresentam em sua composição química elevado teor de gordura podem promover a formação da 2-alcilciclobutanonas após serem irradiados com doses elevadas. As 2-alcilciclobutanonas possuem risco toxicológico potencial que podem afetar à saúde humana (Roberts, 2014).

Quando absorvida por um material biológico, a radiação ionizante pode ter ação direta ou indireta sobre o material. O efeito direto ocorre quando a radiação age diretamente no material biológico, causando excitação ou ionização de moléculas do ácido nucléico, podendo conduzir a morte celular (Alcarde et al., 2003).

O efeito indireto é ocasionado pela interação da radiação com a molécula de água (radiólise), gerando radicais livres. A maior presença de água no alimento resulta em maior produção de radicais livres, trazendo consequências, como a diminuição de nutrientes (Tritsch, 2000).

1.2.1 Radiólise da água

Em alimentos que contêm alto teor de umidade, a água é ionizada pela irradiação (Fellows, 2006) e produz moléculas ionizadas, excitadas e elétrons livres, esse fenômeno é conhecido como radiólise da água (WHO, 1994).

Durante a radiólise as moléculas de água atingem um estado excitado (H_2O^*) ou então propicia a formação de produtos radiolíticos como o elétron hidratado ou aquoso (e^-_{aq}), hidrônio (H_3O^+), água ionizada (H_2O^+), radical hidroperoxila H_2O^- , os quais, por serem instáveis podem levar à formação de radicais livres, peróxido de hidrogênio, radical de hidrogênio ($\text{H}^\cdot$), radical de hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), hidroperoxila ($\text{HO}_2^\cdot$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Os radicais livres se caracterizam por serem muito reativos (Breen e Murphy, 1995; Riley, 1994).

A interação da radiação ionizante com uma molécula de água forma espécies ionizadas e excitadas como:

O íon positivo reage com a água formando um radical hidroxila e H_3O^+

Os produtos H_2O^+ e H_2O^- são muito instáveis podendo se dissociar em:

Algumas reações são formadas como consequência da interação entre a molécula de água e a radiação ionizante. Os principais produtos moleculares estão mostrados abaixo:

A radiólise da água é o mecanismo mais importante no processo de irradiação de materiais em soluções aquosas. Os elétrons, os íons carregados

positivamente e as espécies excitadas são os precursores das alterações químicas no produto irradiado (Kubesh et al., 2005).

1.2.2 Situação Sanitária de Alimentos Irradiados

A Organização Mundial de Saúde (OMS) em conjunto com Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) aprovam e recomendam à irradiação de alimentos, em doses que não comprometam suas características sensoriais. A partir disso, a irradiação de determinados alimentos foi aprovada por autoridades de saúde em aproximadamente 60 países (Delincée, 2005).

No Brasil a ANVISA é a agência reguladora, vinculada ao Ministério da Saúde, responsável pelo controle sanitário de todos os produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, este órgão monitora e certifica os alimentos que tenham sido intencionalmente submetidos ao processo de radiação ionizante (Anvisa, 2001).

As normas para o emprego desta tecnologia estão descritas na Resolução nº 21 de 25 de janeiro de 2001, autorizada pela ANVISA que preconiza o uso da irradiação de alimentos com finalidade sanitária, fitossanitárias e/ou tecnológicas. Esta resolução estabelece que a dose máxima absorvida seja inferior àquela que comprometa as propriedades e os atributos sensoriais e nutricionais do alimento, e que a dose mínima aplicada seja suficiente para atingir o objetivo desejado (Anvisa, 2001).

A Resolução RDC nº 21 determina que os alimentos devem apresentar condições higiênicas aceitáveis para ser submetido ao processo de irradiação, todo produto tratado por energia ionizante deve ser identificado no seu rótulo com o símbolo da radura (FIG. 1.5) ou descrito como alimento tratado por processo de irradiação.

FIGURA 1.5 – Radura: símbolo internacional para alimentos irradiados

1.2.3 Aceleradores de Elétrons

Os aceleradores de elétrons são máquinas emissoras de elétrons que consistem de um catodo aquecido para fornecer elétrons e um tubo com vácuo no qual os elétrons são acelerados por um campo eletrostático de alta voltagem. Os dispositivos mais difundidos são os aceleradores de elétrons, acelerados *Van der Graaff* e os cíclotrons (Fellows, 2006).

Fontes emissoras de elétrons são usadas em aplicações que vão desde estudos fundamentais de interação entre partículas, *cross-linking* em cadeias poliméricas, aplicações médicas e até na irradiação de alimentos. As principais vantagens destas fontes emissoras são que elas podem ser desligadas depois de utilizadas e podem ser direcionados sobre o alimento embalado (Martins e Silva, 2014).

Em aplicações industriais existem aceleradores de elétrons de 500 keV à 10 MeV de energia, que são utilizados para a irradiação da superfície de materiais sólidos, conservação de alimentos, esterilização médica, digitalização de carga e outros produtos industriais (Mittal, 2012).

A aplicação de aceleradores lineares de elétrons de 5 MeV de energia tem a limitação de não penetrar profundamente nos alimentos em comparação com equipamentos de energia de 10 MeV. Na China, as fontes emissoras de raios gama de ^{60}Co e aceleradores de elétrons de baixa energia tendem a ser substituídos por aceleradores lineares de elétrons de 10 MeV (potência > 10 kW), por fornecerem uma capacidade de processamento. Assim, com 10 MeV a irradiação por feixe de elétrons é mais adequada para a aplicação industrial em larga escala (Yang et al., 2014).

Estudo realizado por Miller (2005) utilizou aceleradores de elétrons com janela de titânio de 0,003 polegadas. O estudo mostrou o comportamento da deposição da energia de elétrons em meio aquoso pela densidade superficial, aplicando diferentes faixas de energias (1 à 10 MeV).

O código TIGER unidimensional de Monte Carlo foi o modelo usado para descrever o comportamento de deposição de energia na água para diferentes energias cinéticas de elétrons como está mostrado na FIG. 1.6.

FIGURA 1.6 - Comportamento da deposição de energia em meio aquoso para diferentes energias cinéticas produzidas por aceleradores de elétrons
Fonte – Adaptado de Miller (2005)

O gráfico mostra que com o aumento da energia cinética do feixe de elétrons há uma maior penetração dos elétrons na água. Observou-se que a interação da energia cinética com o meio contribui para o decréscimo da energia de deposição. É evidente que a energia de deposição ao atingir um valor máximo é seguida de uma diminuição linear. Entretanto, a energia depositada não tem a tendência de cair para zero abruptamente. Este resultado é uma consequência da energia dispersa, do espalhamento e do freamento dos elétrons no meio.

A perda de energia específica ou poder de freamento é definida como a taxa de perda de energia sofrida por uma partícula carregada em atravessar um comprimento de caminho ($-dE/dx$) e está relacionado à carga e velocidade da partícula incidente e das propriedades físicas do meio (Rivadeneira et al., 2007).

O poder de freamento pode ser expressa pela Equação 1.1 (Ryan e Poston, 2005):

$$-\frac{dE}{dx} = \left(-\frac{dE}{dx}\right)_{col} + \left(\frac{dE}{dx}\right)_{rad} \quad (1.1)$$

Quando dividida pela densidade do material, as quantidades são convertidas pelas suas respectivas massas de poder de freamento (Equação 1.2).

$$S = -\left(\frac{dE}{dt}\right) = \left(\left(-\frac{dE}{\rho \cdot dx}\right)_{col} + \left(-\frac{dE}{\rho \cdot dx}\right)_{rad}\right) \cdot \rho \quad (1.2)$$

Sendo ρ : a densidade do meio, $(dE/dx \rho)_{col}$ é a massa de colisão de energia de freamento, que inclui toda a energia perdida nas colisões de partículas que produz diretamente elétrons secundários (raios delta) e excitações atômicas, $(dE/dx \rho)_{rad}$ é a radiativa do poder de freamento em massa que inclui todas as perdas de energia do elétron primário que levam à produção de *bremsstrahlung* (ICRU, 1984). O poder de freamento de colisão para elétrons foi calculado pela Equação 1.3:

$$\left(-\frac{dE}{dx}\right)_{col} = \frac{2 \pi k_o^2 e^4 n}{mV^2} \left[\ln \frac{mV^2 T}{2I^2(1-\beta^2)} - \left(2\sqrt{1-\beta^2} - 1 + \beta^2\right) \ln 2 + 1 - \beta^2 + \frac{1}{8} \left(2 - 2\sqrt{1-\beta^2} - \beta^2\right) \right] \quad (1.3)$$

Sendo: $(dE/dx)_{col}$ a perda de energia específica ou poder de freamento; k é o número de átomos por unidade de volume; e : representa a carga do elétron; Z : representa o número atômico do material de barreira; m_e é a massa em repouso do elétron; v : é a velocidade dos elétrons; $\beta = v/c$; na qual, c : é a velocidade da luz. A derivada da energia de freamento pela derivada da distância $(-dE/dx)$ é expresso por joules por metro (J/m).

1.3 Métodos analíticos de extração

1.3.1 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (SPE – *Solid Phase Extration*) é um método rápido, flexível, de fácil manipulação empregada para separar e isolar um ou mais analitos presentes em uma mistura líquida ou extrato de uma mistura sólida, de acordo com as suas propriedades químicas e físicas (Kang et al., 2011). O SPE é útil para a pré-concentração de analitos, extração, *clean up* e estocagem de diversos tipos de amostras. Este procedimento é muito empregado na purificação de resíduos de pesticidas e pode ser aplicada em várias matrizes como: substâncias químicas, sangue, água, tecidos animais e vegetais, etc. A SPE baseia-se fundamentalmente no condicionamento da coluna, a retenção do analito, a lavagem da coluna e a eluição, como mostra a FIG. 1.7.

FIGURA 1.7 – Princípio de extração em fase sólida
Fonte - Adaptado de Bel Hadj-Kaabi (2008)

A etapa de condicionamento consiste em preparar a coluna para receber a amostra e ativa-la com água e/ou solvente orgânico, em seguida os analitos

presentes em uma matriz líquida são percolados através de cartucho de SPE e adsorvidos em um sorvente sólido. Na etapa de lavagem os interferentes são removidos com solventes orgânicos, enquanto os analitos de interesse permanecem retidos no adsorvente. Por fim, a coluna é eluída com solventes orgânicos recuperando os analitos e obtendo os extratos mais limpos (Zhang et al., 2012).

A SPE emprega pequenas colunas de extração, preenchidas com adsorventes que permite uma separação eficaz dos componentes da matriz. Existem vários tipos de colunas, as principais são as colunas de sílica gel e C₁₈, que garantem rapidez, economia, eficiência na preparação das amostras.

A fase extratora empacotada possui diversos formatos (FIG. 1.8) e podem ser utilizadas na forma de cartuchos e seringas de polipropileno e polietileno com a presença de discos porosos denominados *frits*. Os SPE podem ser usados discos e ainda como bandeja ou placas de 96 poços em cada poço possui um cartucho com fase extratora ou discos possibilitando processamento de amostras de maneira mais rápida.

FIGURA 1.8 – Alguns tipos de colunas de SPE
Fonte - Adaptado de Thurman e Snavely (2000)

1.3.2 Metodologias de análise de resíduos de pesticidas em alimentos

O preparo da amostra tem como finalidade extração do analito da matriz e remover quaisquer interferentes (*clean up*) que interfiram no desempenho do instrumento analítico (Kinsella et al., 2009; Wiilkowska e Biziuk, 2011). A amostragem deve ser representativa e o pré-tratamento da amostra deve ser eficiente para não comprometer a determinação cromatográfica (Tadeo, 2000).

O pré-tratamento e/ou a extração de resíduos de pesticidas presentes nos alimentos pode abordar diferentes metodologias, como Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD), Extração em Fase Sólida (SPE), Microextração em Fase Sólida, (SPME), Extração Assistida por Microondas (MAE), Extração Líquida Pressurizada (PLE), Extração com Fluido Supercrítico (SFE), Extração Sortida em Barras de Agitação (SBSE), Rápido, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro (QuEChERS) e Microextração Empacotada por Sorbentes (MEPS) (Tadeo et al., 2000; Abdel-Rehim, 2011; Zhang et al., 2012), extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE-LTP), Polímeros Molecularmente Impressos (MIPs) (Zhang et al., 2012).

As metodologias desenvolvidas atualmente para o preparo de amostras procuram reduzir fontes de erros, aumentar a sensibilidade para identificação e quantificação dos analitos, além de utilizar volumes menores de amostras e solventes como os QuEChERS e os MIPs (Anastassiades et al., 2003; Abdel-Rehim, 2011).

1.3.3 Extração com solvente

A extração líquido-líquido (ou do inglês, *liquid-liquid extraction* - LLE) pode ser considerada como operação tradicional e simples para o preparo de amostras (Botitsi et al., 2007; Lambropoulou e Albanis, 2007; Liu et al., 2011).

A LLE é uma técnica empregada nos processos de separação de um ou mais compostos de uma mistura líquida. O método consiste na transferência dos analitos presentes em uma matriz líquida para outra fase líquida imiscível (solvente orgânico menos polar ou apolar), de acordo com as diferenças de solubilidade dos produtos nestas duas fases (Blackadder e Nedderman, 2004).

A LLE possui as vantagens de ser um método de separação clássico e simples para preparo das amostras e garante a análise de diversos compostos químicos com extratos de ótima seletividade para alguns analitos específicos (Queiroz et al., 2001).

A LLE apresenta as seguintes desvantagens: utiliza grande volume de solvente orgânico elevando custo do processo, operação de difícil automação, pode apresentar baixa repetibilidade e reprodutibilidade em virtude das inúmeras

fases de extração, possibilidade de formação de emulsões, e muitas vezes não é capaz de eliminar os interferentes presentes em matrizes complexas (Beyer e Biziuk, 2008; Blackadder e Nedderman, 2004).

1.3.4 QuEChERS

Em 2003, Anastassiades e colaboradores desenvolveram o QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*). Esta metodologia foi elaborada para a extração de pesticidas, aplicada principalmente em alimentos para reduzir as limitações práticas de métodos de extração de multirresíduos.

Rotineiramente, o QuEChERS é utilizado para quantificar os níveis de pesticidas em alimentos (Albert et al., 2014; Kruve et al. 2008), sendo empregado especificamente pelos métodos oficiais da AOAC 2007.01 e da EN 15662.

As vantagens do método QuEChERS incluem a rapidez de análise, a maioria dos solventes empregados são pouco poluentes e tóxicos, permite a redução significativa de contaminações nas amostras, baixo consumo de solventes, uso de material descartável, muito fácil de manusear e apresenta baixos custos (Lehotay, 2005).

O método QuEChERS original, representado na FIG. 1.9, envolve uma extração inicial de 10 g de amostra com 10 mL de acetonitrila (ACN) que promove uma partição líquido-líquido facilitado a remoção de componentes polares da matriz. Em seguida, adiciona-se de 4 g de sulfato de magnésio anidro (MgSO_4), agente secante que remove o excesso de água presente na amostra, e mais 1 g de cloreto de sódio (NaCl), para o ajuste da força iônica em um tubo, após centrifugados causam o efeito *salting out*. O emprego do MgSO_4 foi devido a sua capacidade de absorção de água em relação a outros sais, além de ser processo exotérmico, resultando num aquecimento de 40 a 45 °C, que aumenta a velocidade de extração (Anastassiades et al., 2003).

FIGURA 1.9. - Esquema da técnica de extração QuEChERS
Fonte - Adaptado de Macedo (2012)

Para remover a água residual e realizar fase de limpeza ou de *clean up* deve-se retirar uma alíquota de 1 mL da fase sobrenadante, adiciona-se 150 mg de MgSO_4 e 25 mg do adsorvente amina primária e secundária (PSA - composto por grupos etilenodiamina-N-propil ligados à sílica) são simplesmente misturadas com 1 mL extrato de acetonitrila (Anastassiades et al., 2003). O PSA tem a função de remover açúcares, ácidos graxos, ácidos orgânicos e pigmentos (Wilkowska e Biziuk, 2011). A etapa de *clean up* da amostra tem como finalidade, remover os interferentes e componentes polares da matriz, como ácidos orgânicos, pigmentos polares, açúcares, entre outros, (Anastassiades et al., 2003) antes de realizar a análise cromatográfica (Payá et al., 2007).

Anastassiades e colaboradores (2003) determinaram a relação de 10 g de amostra e 10 mL de ACN, pois em testes experimentais os autores notaram que grande parte de agrotóxicos mais polares não foram bem extraídos pelo solvente usando a relação de 10 g de amostra e 5 mL de ACN. O solvente mais empregado na extração QuEChERS é ACN, entretanto a acetona e acetato de etila podem ser utilizados como solventes alternativos (Anastassiades et al., 2003).

1.3.5 Síntese de polímeros de impressão molecular por via radicalar

1.3.5.1 Princípio da impressão molecular

A impressão molecular é um método versátil e simples para a preparação de receptores artificiais que contêm sítios de reconhecimento específico e alta seletividade para uma determinada substância ou para um grupo de substâncias estruturalmente semelhante (Tamayo, 2007).

Nos últimos anos, os MIPs são aplicados em diferentes áreas, tais como: na extração em fase sólida (SPE) (Tamayo, 2007), na indústria de fármacos (Puoci, 2011), usado para mimetizar catálise enzimática (Resmini, 2012), têm sido amplamente estudados para a remoção de poluentes ou substâncias tóxicas no meio ambiente, entre outros (Li et al., 2012; Cao et al., 2014). O MIP é utilizado para garantir maior seletividade a métodos de preparo de amostras que visam à limpeza e concentração dos analitos antes da determinação dos mesmos.

A seletividade dos MIPs está relacionada ao reconhecimento de molécula de interesse que foi estabelecida como molde (também conhecido como *template*, molécula chave, molécula alvo, molécula impressa ou analito).

O processo de impressão molecular inicia-se com a interação da molécula impressa por meio de ligação covalente ou não com os monômeros funcionais, formando um complexo estável monômero-*template*. Essa interação leva a formação de interações reversíveis e posições específicas das extremidades dos monômeros ao redor da molécula alvo (Lord et al., 2000; Haupt e Mosbach, 1999). Posteriormente, é adicionado o agente reticulante que promove ligações cruzadas no monômero para formar uma matriz polimérica rígida. Com a adição do iniciador radicalar inicia-se a reação de polimerização (Tarley et al., 2005).

A polimerização ocorre dentro um tubo em presença de um solvente porogênico entre monômeros complexados com o molde e o agente reticulante para formar cavidades específicas.

Posteriormente, com o monólito formado realiza-se a moagem, peneiramento, sedimentação, transfere o MIP para um cartucho (Lordel, 2011) para a remoção do *template* do suporte polimérico com uso de solventes porogênicos ou com a clivagem químicas (Ye e Mosbach, 2001). As cavidades

geradas são similares à molécula de impressão em forma e tamanho, e apresentam sítios ativos vazios que promovem as interações específicas com a molécula molde. O processo de impressão molecular está ilustrado na FIG. 1.10.

FIGURA 1.10 - Polímero de molécula impressa
Fonte – Adaptado de Haupt (2003)

A seletividade dos MIPs está relacionada com o processo de síntese, das proporções molares entre o *template* e monômero funcional, a escolha do solvente, a qualidade e quantidade do agente reticulante e iniciador radicalar, além do tempo da reação de polimerização.

Os MIPs podem ser sintetizados por três métodos diferentes, covalente, não-covalente e semi-covalente, dependendo da natureza de ligação entre monômeros funcionais e a molécula molde.

1.3.5.2 Interações moleculares para preparo do MIP

O preparo do MIP por ligações covalentes entre a molécula alvo e os monômeros utiliza o mesmo tipo de interações que os sistemas de reconhecimento molecular que são: ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e interações π (Albericio e Tulla-Puche, 2008). Neste tipo de impressão, adiciona-se uma grande quantidade de monômero, formando maiores números de locais de ligação não específicos, porém diminuindo a seletividade da ligação (Albericio e Tulla-Puche, 2008; Komiyama et al., 2004).

Polímeros constituídos por ligação covalente possuem sítios mais seletivos, devido à uniformidade gerada nos mesmos, possui um limitado número de moléculas compatíveis com a cinética de ligação, clivagem entre os monômeros (Abdullah et al., 2006).

A impressão não-covalente recebe essa denominação devido as ligações entre os monômeros funcionais e o *template*. Esse tipo de impressão tem sido empregado como estratégia para formação de sítios específicos de reconhecimento molecular com maior uniformidade, isso ocorre, pois a clivagem entre os monômeros e a molécula é realizada lentamente (Abdullah et al., 2006). As interações não-covalentes que podem ocorrer são: ligações de hidrogênio, iônica, íon-dipolo, dipolo-dipolo e dipolo-dipolo induzido (Abdullah et al., 2006). A principal desvantagem é a formação de sítios de ligação heterogêneos (Ye e Mosbach, 2001).

A impressão de polímeros por ligações semi-covalentes combina a impressão covalente e não-covalente. Neste procedimento de polimerização, a molécula impressa e o monômero funcional se ligam por interações covalentes e são facilmente separadas por clivagem hidrolítica. Os grupos ainda presentes na cavidade formada após a hidrólise têm a capacidade de estabelecer ligações com o *template* por meio de ligações não covalentes (Albericio e Tulla-Puche, 2008; Navarro et al., 2011).

1.3.5.3 Reagentes para síntese de MIPs

O desenvolvimento dos MIPs consiste na adição dos seguintes reagentes no meio reacional: *template*, o monômero funcional, agente reticulante, solventes e iniciador radicalar. A seleção dos reagentes para síntese de MIP deve ser criteriosa, pois estes determinam a superfície morfológica, natureza química e o desenvolvimento de sítios específicos de reconhecimento molecular.

Nesse contexto, a escolha da molécula impressa deve possuir em sua estrutura grupos funcionais que interajam fortemente com os monômeros para gerar o complexo estável entre eles. A interação entre *template*-monômero em sínteses não covalente são formadas durante a reação de polimerização como as ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, as ligações do tipo π - π ou interações ligação metálica. O *template* deve ser estável e quimicamente inerte durante o processo de polimerização (Sousa e Barbosa, 2009; Cormack e Elorza, 2004).

A escolha do monômero funcional depende principalmente da sua interação com a molécula impressa para obter uma perfeita interação e, conseqüentemente, obtenção de sítios específicos seletivos. Os compostos que possuem grupos básicos interagem com maior facilidade com monômeros que apresentem grupos ácidos, por exemplo, o ácido metacrílico, realizando ligações de hidrogênio ou eletrostáticas. No entanto, moléculas ácidas impressas reagem preferencialmente com monômero de caráter básico, como: o 4-vinilpiridina (Tarley et al., 2005), para formação do polímero, o estireno seria capaz de realizar interações de natureza hidrofóbica e do tipo π - π (Lordel, 2011).

Na FIG 1.11 estão representados alguns monômeros funcionais utilizados na síntese de MIP. Estes compostos químicos caracterizam-se por possuir potencialidade de interação iônica e de ligação de hidrogênio (Tarley et al., 2005).

FIGURA 1.11 - Monômeros funcionais comumente empregados na síntese do MIP

A interação entre o monômero funcional e o *template* obedece ao princípio de *Le Chatelier*. O incremento da concentração do monômero funcional ocasiona o deslocamento do equilíbrio químico na direção da formação do complexo. Desta forma, na síntese polimérica o monômero deve ser inserido em maiores quantidades, geralmente uma proporção de 4:1 (monômero: molécula impressa), para deslocar o equilíbrio e formar o maior número possível de sítios específicos de reconhecimento (Martín-Esteban, 2001; Yan e Ho Row, 2006; Mayes e

Whitcombe, 2005). O monômero funcional garante ao MIP as características mecânicas como a rigidez e porosidade (Martín-Esteban, 2001).

A escolha do solvente é outro aspecto fundamental para o desenvolvimento do MIP. A sua principal finalidade é solubilizar os reagentes da síntese polimérica (*template*, monômeros funcionais, reagente reticulante e iniciador radicalar). O solvente contribui na construção de sítios seletivos (Tarley et al., 2005; Yan e Ho Row, 2006; Mayes e Whitcombe, 2005) e suas propriedades não devem interferir na formação do complexo entre o monômero funcional e a molécula molde (Pichon, 2007). Os solventes mais adequados para síntese de MIP devem possuir caráter ligeiramente polar e apróticos, como o diclorometano e a acetonitrila, para desenvolver as interações polares entre o monômero funcional e a molécula impressa por ligações de hidrogênio ou eletrostáticas. O emprego de um solvente polar favorece o desenvolvimento das interações de natureza hidrofóbica (Lordel, 2011). O solvente contribui na construção de macroporos no suporte polimérico por isso é denominado solvente porogênico (do grego formador de poros) (Cormack e Elorza, 2004; Martín-Esteban, 2001; Yan e Ho Row, 2006; Mayes e Whitcombe, 2005).

A estabilidade mecânica, sítios de ligação e a textura da matriz polimérica podem ser garantidos com emprego do agente reticulante ou reagente de ligação cruzada. Este reagente promove as ligações cruzadas no polímero, conferindo uma estrutura rígida e tridimensional ao redor do *template*, proporcionando a estabilidade da molécula alvo com o monômero. O agente de reticulação deve ser inserido em excesso molar em relação aos outros reagentes para permitir a obtenção de cavidades bem definidas (Yan e Ho Row, 2006; Mayes e Whitcombe, 2005).

A FIG. 1.12 ilustra alguns reagentes de ligação cruzada que podem ser utilizados na impressão molecular. Contudo, o etileno glicol dimetacrilato (EGDMA) tem sido o reagente mais utilizado por conferir ao MIP propriedades térmicas e mecânicas estáveis com fácil transferência de massa (Cormack e Elorza, 2004; Tarley et al., 2005).

FIGURA 1.12 - Estrutura química de alguns agentes de ligação cruzada usados na síntese de MIP

A presença dos agentes de síntese (*template*, monômero funcional, agente reticulante e solvente) não é suficientemente capaz de desenvolver os radicais livres para a polimerização. Portanto, o emprego de iniciadores radiculares em associação com estímulos físicos como temperatura e/ou radiação UV, são fundamentais para iniciar e manter a reação de polimerização do MIP. Vários iniciadores radicalar (FIG. 1.13) podem ser empregados na síntese do MIP, o 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN) é o mais comumente empregado (Cormack e Elorza, 2004).

FIGURA 1.13 - Estrutura química dos iniciadores radiculares mais utilizadas na síntese de MIP

A capacidade de reconhecimento molecular do MIP deve ser avaliada em relação a um Polímero Não Impresso (NIP- do inglês *Non Imprinted Polymer*). Este polímero é sintetizado com a mesma metodologia que o MIP, mas sem a adição do *template* no meio reacional. O NIP pode ser denominado como um polímero de controle por não possuir sítios específicos de ligação (Yan e Ramström, 2005).

Outro fator de grande importância no desenvolvimento de sítios ativos e seletividade dos MIPs é a proporção relativa de todos os reagentes. A razão molar utilizada na maioria das vezes durante a síntese de MIP é representado por: 1/4/20 (*template* / monômero / agente reticulante). Esta proporção parece ser o mais favorável para a produção da maioria dos polímeros. Com efeito, ele permite formar interações estáveis entre o monômero e molécula-molde formando sítios ativos mais seletivos (Lordel, 2011).

1.3.5.4 O estado da arte no preparo dos MIP

As sínteses radicalar dos MIPs, convencionalmente, têm sido preparadas por polimerização radicalar, em que as reações ocorrem em um sistema homogêneo. O monômero funcional e molécula impressa são dissolvidos com solvente dentro de um frasco de vidro, para que ocorra formação de ligações estratégicas em posições específicas e complementares. Em seguida, adiciona-se o agente de ligação cruzada responsável pela interligação do monômero funcional, formando uma rede polimérica. A polimerização ocorre somente após a

adição do iniciador radicalar, responsável pelo fornecimento de radicais reativos que dão início e continuidade à reação (Cormack e Elorza, 2004; Martín-Esteban, 2001; Yan e Ho Row, 2006; Mayes e Whitcombe, 2005; Tarley et al., 2005).

A polimerização ocorre na ausência de oxigênio sob fluxo de gás nitrogênio ou argônio e é induzida com aquecimento e/ou radiação UV. O oxigênio deve ser retirado do meio reacional para não retardar a reação de polimerização radicalar. O sólido polimérico resultante é triturado, peneirado e submetido à lavagem com solvente para extração da molécula impressa. O polímero caracteriza-se por ter tamanho homogêneo com formato irregular (Andersson e Nicholls, 2003; Sun et al., 2006).

A metodologia para obtenção do suporte polimérico é empregada em diversas técnicas de preparo e concentração de amostras, tais como SPE, SPME, entre outras (Thibert et al., 2012; He et al., 2010; Balamurugan et al., 2012).

1.3.6 Síntese de moléculas impressas por via sol-gel

Na Sílica Impressa Molecularmente realizada pela rota sintética sol-gel ocorre a transição do sistema sol para uma rede polimérica rígida e porosa, o sistema gel. O termo sol é definido como uma dispersão de partículas coloidais (dimensão entre 1 e 100 nm) estável em um fluido, e o termo gel pode ser caracterizado como um sistema com estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias poliméricas (gel polimérico) (Silva, 2009).

O processo sol-gel permite a produção de um polímero inorgânico por meio de reações químicas simples e a temperaturas entre 20 e 150 °C. A técnica de sol-gel emprega materiais híbridos (orgânico-inorgânico) baseados em sílica na sua estrutura polimérica. O emprego de materiais híbridos confere polímero estável, robusto, com elevado grau de reticulação. A rota sintética sol-gel é caracterizada pela facilidade de preparo do MIS e apresenta larga faixa de aplicações (Mujahid et al., 2010).

A reação de polimerização sol-gel esta dividida em duas etapas: reação de hidrólise e reação de condensação de monômeros em meio básico ou ácido.

Normalmente, as reações de hidrólise e condensação ocorrem ao mesmo tempo, logo que a hidrólise se inicia. As reações do processo sol-gel têm início

quando o monômero funcional é diluído em água, na presença de um catalisador básico ou ácido.

As reações químicas que ocorrem durante a síntese sol-gel estão representadas abaixo:

- Hidrólise de grupos alcóxidos para formar grupos silanóis reativos

- Condensação de grupos silanóis inicialmente formando o sol e posteriormente o gel:

Condensação em água

Ou condensação em álcool

As reações de hidrólise e condensação ocorrem com reações de substituição nucleofílica nos átomos de silício (SILVA, 2006). Durante as reações da rota sol-gel há a formação de grupos silanóis ($\equiv\text{Si-OH}$) na hidrólise, enquanto que as reações de condensação levam a formação de ligações siloxano ($\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$). Ao passo que as reações de hidrólise e condensação ocorrem, as moléculas se agregam em uma suspensão coloidal, formando uma rede polimérica que abrange toda a mistura reacional (gelificação), e, conseqüentemente, a formação do gel (Silva, 2009).

O processo sol-gel é relativamente complexo. Os parâmetros que afetam fortemente nos processos de hidrólise, condensação e nas propriedades físicas do gel (distribuição e a média de tamanho do poro) estão relacionados com a proporção de água/silano, a natureza e concentração do catalisador, tempo, temperatura da reação, monômeros alcóxidos e a concentração dos reagentes (Silva, 2009).

A natureza do catalisador, ácido ou básico, age diretamente na cinética de reação da formação do polímero, influenciando as taxas das reações de hidrólise e condensação.

Em geral, o emprego de catalisadores ácidos, acarreta a hidrólise lenta e condensação rápida, o que leva a formação de um material com propriedade mais densa e com baixa porosidade. Na catálise ácida, a condensação ocorre preferencialmente entre grupos silanóis localizados nos monômeros formando compostos de cadeias lineares com baixa formação de poros (Gupta e Kumar, 2008; Silva, 2009).

Em condições básicas, a hidrólise é rápida, enquanto a condensação é lenta, permitindo maior reticulação do material e a formação de géis particulados, com grande porosidade intersticial. As interconexões das partículas esféricas formam géis coloidais com poros mais volumosos com diâmetros das partículas entre 2 e 50 nm (Gupta e Kumar, 2008, Silva, 2009). O uso de um catalisador básico e a água favorece obtenção de ligação cruzada significativa na polimerização (Lordel, 2011).

A utilização das matrizes sol-gel para impressão molecular pode ser obtido com procedimento não covalente. A molécula molde deve ser adicionada na solução sol-gel antes de iniciar as reações de hidrólise e condensação. Com a adição de solventes polares e emprego de um monômero funcional do sol-gel apolar os sítios de impressão molecular são formados por forças de *van der Waals*, forças eletrostáticas, entre outras. Após a etapa de hidrólise, condensação e sobre tudo com a evaporação do solvente, ocorre a formação dos sítios de impressão de acordo com a afinidade da molécula alvo com a matriz sol-gel.

O monômero funcional deve ser selecionado rigorosamente para gerar a porosidade e facilitar a difusão da molécula impressa por meio dos sítios ativos da matriz polimérica (Silva, 2009). Os precursores organosiliconados possuem fórmula geral, $R_4-xSi(OR)_x$, a qual $x=1-4$, podem ser obtidos por diferentes rotas sintéticas. Os mais empregados na síntese de polímeros por sol-gel são os trialcóxissilanos e tetraalcóxissilanos. Os trialcóxissilanos são utilizados devido às características de hidrofobicidade e a reatividade. Contudo, no preparado do MIS, que são concebidos a partir de silanos, que é dizer que o monômero utilizado é composto por sílica ($Si(OR)_4$) - os tetraortoalcóxissilanos, conferindo aos

polímeros cadeias tridimensionais altamente entrecruzadas (Gupta e Kumar, 2008; Díaz-Garcia e Laíno, 2005; Silva, 2009).

O agente de reticulação é empregado para interagir na hidrólise e promover a formação de uma rede multi-dimensional. Os agente de reticulação são geralmente tetraetoxissilano (TeOS) ou tetrametoxissilano (TMOS) (Lordel, 2011).

Finalizada a polimerização, submete-se o MIS a moagem, peneiramento, sedimentação, em seguida empacotados em cartucho para a remoção da molécula molde com lavagem de solventes orgânicos. Com remoção do *template* os sítios de ligação específicos tornam-se capazes de fixar o analito alvo.

A Sílica Impressa Molecularmente foram desenvolvidas e aplicadas em diversos trabalhos científicos como: a extração da hemoglobina presente em bovinos (Liu et al., 2008), florfenicol presente em carnes de peixe e frango (Sadeghi e Jahani, 2014), obtenção de metilxantinas (Silva e Augusto, 2006), para o controle de ácido salicílico (Li et al., 2014), o colesterol presente leite (Clausen, et al., 2014) e naftaleno (Guo et al., 2011).

1.3.7 Caracterização do Suporte Impresso

A avaliação dos MIPs e dos MIS pode ser realizada de diversas formas para caracterização dos polímeros e verificar a presença de cavidades, como:

- Análise da solução de eluição após sua percolação no adsorvente impresso presente na coluna por cromatografia;
- Avaliação da fixação do analito, diluído em solvente, em um polímero impresso;
- Estudo dos perfis de eluição após a percolação da molécula impressa diluída em um determinado solvente pelo polímero impresso em SPE (Lordel, 2011).

O polímero impresso é caracterizado em SPE com quatro etapas no protocolo de extração: condicionamento, percolação, lavagem e eluição, representado na FIG. 1.14.

FIGURA 1.14 – Etapas do perfil de eluição envolvido no processo SPE
 Fonte - Adaptado de Bel Hadj-Kaabi (2008)

O adsorvente é condicionado com água ou solventes orgânicos para a ativação das cavidades e a interação efetiva dos analitos de interesse. No final desta etapa, a fase sólida deve estar umidificada e com uma camada de solvente de 2 mm aproximadamente, para que não ocorra problemas de reprodutibilidade da metodologia e evitar a formação de caminhos preferenciais (Lanças, 2004).

Os analitos presentes em uma matriz líquida são percolados através de cartucho SPE, nesta etapa o controle da vazão da percolação da amostra é extremamente importante para garantir a reprodutibilidade da metodologia e também para promover a interação suficiente entre a fase extratora e os analitos (Hennion, 1999; Lanças, 2004). Geralmente, a percolação da amostra deve ser lenta com vazão inferior a 2 mL/min, podendo ser controlado aplicando vácuo no sistema (Lanças, 2004).

Na etapa de lavagem os interferentes são removidos com solventes orgânicos (*clean up*), enquanto os analitos de interesse permanecem retidos no adsorvente. O volume e a composição da solução da etapa de lavagem são estimados através de testes experimentais, analisando as frações do eluente coletado para estabelecer a condição que ocorra a remoção dos interferentes

presentes na matriz e não haja liberação dos analitos de interesse antes da etapa de eluição.

A seguir a coluna é eluída com pequenos volumes de solventes orgânicos para não ocorrer à diluição do analito. Nesta etapa o eluato pode ser seco com gás e ser ressuspenso com solventes adequados, seguido da análise cromatográfica (Hennion, 1999). O solvente de eluição deve extrair os analitos de interesse, favorecer a diluição de compostos da matriz que não tenham sido retirados na etapa de lavagem (Lanças, 2004) para obter extratos mais limpos (Zhang et al., 2012).

Segundo Lordel (2011) o perfil de extração ideal está apresentado na FIG.1.15. O gráfico descreve o comportamento da recuperação total dos analitos na fração de eluição para os polímeros impressos e para os polímeros não impressos antes da fração de eluição, o que representa um rendimento de extração de 100 % nos materiais impressos e de 0 % nos materiais não impressos. Ainda na FIG. 1.15 mostra que a retenção do analito ocorreu devido a presença de cavidades específicas nos polímeros impressos. Os polímeros impressos se caracterizam por serem retentivo e seletivo para um determinado analito. A comparação com polímero não impresso é fundamental para caracterizar o polímero impresso.

FIGURA 1.15 - Perfil ideal após o processo de extração realizado em polímeros impressos e não impressos, sendo P = Percolação, L = Lavagem e E = Eluição

Fonte - Adaptado de Lordel (2011)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbent (MEPS): a tutorial. ***Anal. Chim. Acta***, v. 701, p. 119-129, 2011.
2. ABDULLAH, J.; AHMAD, M.; HENG, L. Y.; KARUPPIAH, N.; SIDEK, H. Stacked films immobilization of MBTH in nafion/sol-gel silicate and horseradish peroxidase in chitosan for the determination of phenolic compounds, ***Anal. Bioanal. Chem.***, v. 386, n. 5, p. 1285-1292, 2006.
3. AGROFIT - ***Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários***. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit-cons/principal-agrofit-cons>>. Acesso em: 10 jan. 2015.
4. ALBERICIO, F.; TULLA-PUCHE, J. The Power of Functional Resins in Organic Synthesis. 1.ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2008.
5. ALBERT, A.; KRAMER, A.; SCHEEREN, S.; ENGELHARD, C. Rapid and quantitative analysis of pesticides in fruits by QuEChERS pretreatment and low-temperature plasma desorption/ionization orbitrap mass spectrometry. ***Anal. Methods***, v. 6, p. 5463–5471, 2014.
6. ALCARDE, A. R.; WALDER, J. M. M.; HORII, J. Fermentation of irradiated sugar cane must. ***Sci. Agric.***, v. 60, p. 677-681, 2003.
7. AMARO, P. ***A Política de Redução dos Riscos dos Pesticidas em Portugal***. ISA Press. Cadaval, p. 1-176, 2007.
8. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. ***Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate***, 2007.
9. ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHIER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and Dispersive Solid-Phase Extraction for the Determination of Pesticide residues in Produce. ***J. AOAC Int.***, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.
10. ANDERSSON, H. S.; NICHOLLS, I. A. ***Molecularly Imprinted Polymers: Man-made mimics of antibodies their applications in analytical chemistry***. Netherlands: Elsevier; 2003.
11. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. ***Monografias de Agrotóxicos***. ANVISA, 2014. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a88fd880474576798462d43fbc4c6735/P13-Profenof%C3%B3s.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em 12 mar. 2014.

12. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Regulamento técnico para irradiação de alimentos**. ANVISA, 2001. Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº 21, Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
13. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)** - ANVISA - 2001. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/55b8fb80495486cdaecb4ed75891ae/Relat%C3%B3rio+PARA+2010+-+Vers%C3%A3o+Final.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 10 fev. 2015.
14. BALAMURUGAN, K.; GOKULAKRISHNAN, K.; PRAKASAM, T. Preparation and evaluation of molecularly imprinted polymer liquid chromatography column for the separation of Cathine enantiomers. **Saudi Pharm J.**, v. 20, n. 1, p. 53-61, 2012.
15. BASKARAN, S.; KOOKANA, R.; NAIDU, R. Contrasting behavior of chlorpyrifos and its primary metabolite, tcp (3,5,6-trichloro-2-pyridinol), with depth in soil profiles. **Aust. J. Soil Res.**, v. 41, n.4, p.749-760, 2003.
16. BEL HADJ-KAABI, F. **Développement et caractérisation de polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction de composés pharmaceutiques à l'état de traces dans les fluides biologiques. Miniaturisation du format de synthèse et couplage en-ligne à la nano-chromatographie**. 2008. Tese (Doutorado), Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, Paris – França.
17. BIROLI, W. G. **Biodegração do pesticida esfenvalerato por fungos de ambiente marinho**. 2013. Dissertação (mestrado), Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Paulo.
18. BLACKADDER, D. A.; NEDDERMAN, R. M. **Manual de Operações Unitárias**. São Paulo: Hemus Editora Ltda, 2004.
19. BEYER A.; BIZIUK M. Methods for determining pesticides and polychlorinated biphenyls in food samples--problems and challenges. **Crit. Ver. Food Sci. Nutr.**, v. 48, n. 10, p. 888-904, 2008.
20. BOARATTI, M. F. G. **Análise de perigos e pontos críticos de controle para alimentos irradiados no Brasil**. 2004. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), São Paulo.
21. BOTITSI, H.; ECONORMOU, A.; TSIPI, D. Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in processed fruits and vegetables using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 389, n. 6, p. 1685-1695, 2007.
22. BREEN, A. P.; MURPHY, J. A. Reactions of oxyl radicals with DNA. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 18, p. 1033-1077, 1995.

23. CAO, Y.; LIU, L. K.; XU, W. Z.; WU, X. Y.; HUANG, W. H. Surface molecularly imprinted polymer prepared by reverse atom transfer radical polymerization for selective adsorption indole. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 131, n. 13, p. 40473, 2014.
24. CARVALHO, P. H. V. **Desenvolvimento de método para determinação de resíduos de pesticidas em planta medicinal *Cordia salicifolia* utilizando as técnicas de MSPD, GC-MS e HPLC-UV.** Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, Brasil, 2009.
25. CLAUSEN, D. N.; VISENTAINER, J. V.; TARLEY, C. R. T. Development of molecularly imprinted poly(methacrylic acid)/silica for clean up and selective extraction of cholesterol in milk prior to analysis by HPLC-UV. **Analyst**, v. 139, n. 19, p. 5021-5027, 2014.
26. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION - CAC. **Codex general standard for irradiated foods.** Codex Stan, Rev. 1, p. 106-1983, 2003.
27. COOPER, J.; DOBSON, H. The benefits of pesticides to mankind and the environment. **Crop Protection**, v. 26, n. 9, p. 1337-1348, 2007.
28. CORMACK, P. A. G.; ELORZA, A. Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization. **J. Chromatogr. B**, v. 804, p. 173–182, 2004.
29. CYCON, M.; WOJCIK, M.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. and *Pseudomonas* sp. and their use in bioremediation of contaminated soil. **Chemosphere**, v. 76, p. 494–501, 2009.
30. DELINCÉE, H. Chemical and Biological Methods for the identification of irradiated food. **European School of Advanced Studies on Nuclear and ionizing Radiation Technologies: University of Pavia**, Italy, p. 1-6, 2005.
31. DÍAZ-GARCIA, M. E.; Laíno, R. B. Molecular Imprinting in Sol-Gel Materials: Recent Developments and Applications, **Microchim. Acta**, v. 149, n. 1-2, p. 19-36, 2005.
32. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Normas Gerais sobre o Uso de Agrotóxicos Sistemas de Produção, n. 7, 2006. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozTerrasAltasMatoGrosso/normas_gerais_uso_agrotoxicos.htm>. Acesso em: 01 fev. 2015.
33. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY COMMITTED TO ENSURING THAT EUROPE'S FOOD IS SAFE – EFSA. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu>>. Acesso em: 15 fev. 2015.

34. FARKAS, J. Irradiation for better foods. *Trends Food Sci. Tech.*, v. 17, p. 148–152, 2006.
35. FELLOWS, P. J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos**. 2ª Ed Porto Alegre, 2006.
36. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO -. Specifications for Plant Protection Products profenofos (AGP:CP/359), 1998. Disponível em: <http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Old_specs/profen.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2014.
37. GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução. Riscos ao homem e ao meio ambiente, pela avaliação de genotoxicidade, carcinogenicidade e efeitos sobre a reprodução**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, p. 392, 2005.
38. GUO, L.; ZENG, Y.; GUAN, A.; CHEN, G. Preparation and characterization of molecularly imprinted silica particles for selective adsorption of naphthalene. *React. Funct. Polym.*, v. 71, n. 12, p. 1172-1176, 2011.
39. GUPTA, R.; KUMAR, A. Molecular Imprinting in sol-gel matrix. *Biotech. Advances*, v. 26, p. 533, 2008.
40. HAUP, K.; MOSBACH, K. Molecularly imprinted polymers in chemical and biological sensing. *Biochem. Soc. T.*, v. 27, p. 344-350, 1999.
41. HAUPT, K. Molecularly Imprinted Polymers: The Next Generation. *Anal. Chem.*, v. 75, n. 17, p. 376-383, 2003.
42. HE, J.; LV, R.; ZHAN, H.; WANG, H.; CHENG, J.; LU, K.; WANG, F. Preparation and evaluation of molecularly imprinted solid-phase micro-extraction fibers for selective extraction of phthalates in an aqueous sample. *Anal. Chim. Acta*, v. 674, n. 1, p. 53- 58, 2010.
43. HENNION, M. C. Solid-phase extratction: method development, sorvents, and coupling with liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 856, n. 1-2, p. 3-54, 1999.
44. HOLLAND, P. T. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. *Quím. Nova*, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2006.
45. INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo: Editora do IAL, 2008.
46. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **IDS 2010: país evolui em indicadores de sustentabilidade, mas ainda há desigualdades socioeconômicas e impactos ao meio ambiente**, disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1156&id_pagina=1>. Acesso em: 30 mai. 2012.

47. INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIATION UNITS AND MEASUREMENTS – ICRU, 1984. Radiation Dosimetry: Electron Beams with Energies Between 1 and 50 MeV. International Commission on Radiation Units and Measurements, Report No. 35.
48. JICKELLS, S.; NEGRUSZ, A. **Clarke's analytical forensic toxicology**, 3 ed., 2008.
49. KANEKAR, P. P.; BHADBHADE, B. J.; DESHPANDE, N. M.; SARNAIK, S. S. Biodegradation of organophosphorus pesticides. **Proc. Indian Nat. Sci. Acad. B**, v. 70, p. 57–70, 2004.
50. KANG, S.; CHANG, N.; ZHAO, Y.; PAN, C. Development of a method for the simultaneous determination of six sulfonylurea herbicides in wheat, rice, and corn by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, n. 18, p. 9776–9781, 2011.
51. KINSELLA, B.; O'MAHONY, J.; MALONE, E.; MALONEY, M.; CANTWELL, H.; FUREY, A.; DANAHER, M. Current trends in sample preparation for growth promoter and residue analysis. **J. chromatogr. A**, v. 1216, p. 7977–8015, 2009.
52. KOMIYAMA, M.; TAKEUCHI, T.; MUKAWA, T.; ASANUMA, H. Molecular Imprinting: From Fundamentals to Applications, Weinheim: Wiley-VCH, 2004.
53. KRUBE, A.; KUNNAPAS, A.; HERODES, K.; LEITO, I. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1187, p. 58–66, 2008.
54. KUBESH, K.; ZONA, R.; SOLAR, S.; GEHRINGER, P. Degradation of catechol by ionizing radiation, ozone and the combined process ozone electron-beam. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 72, p. 447–453, 2005.
55. LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis. **J. Biochem. Biophys Methods**, v. 70, n. 2, p. 195–228, 2007.
56. LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE)**. Rima editora, São Carlos, 2004.
57. LEHOTAY, S. J. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. **J. AOAC Int.**, v. 90, n. 2, p. 485–520, 2007.

58. LI, B.; XU, J.; HALL, A. J.; HAUPT, K.; BUI, B. T. S. Water-compatible silica sol-gel molecularly imprinted polymer as a potential delivery system for the controlled release of salicylic acid. **J. Mol. Recognit**, v. 27, n. 9, p. 559-565, 2014.
59. LI, H.; XU, W. Z.; WANG, N. W.; MA, X. H.; NIU, D. D.; JIANG, B.; LIU, L. K.; HUANG, W. H.; YANG, W. M.; ZHOU, Z. P. Synthesis of magnetic molecularly imprinted polymer particles for selective adsorption and separation of dibenzothiophene. **Microchim. Acta**, v. 179, n. 1-2, p. 123-130, 2012.
60. LIMA, K. S. C.; GROSSI, J. L. S.; LIMA, A. L. S.; ALVES, P. F. M. P.; CONEGLIAN, R. C. C.; GODOY, R. L. O.; SABAA-SRUR, A. U. O. Efeito da irradiação ionizante γ na qualidade pós-colheita de cenouras (*Daucos carota* L.) cv Nantes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 202-208, 2001.
61. LIU, G.; RONG, L.; GUO, B.; ZHANG, M.; LI, S.; WU, Q.; CHEN., J.; CHEN, B.; YAO, S. Development of an improved method to extract pesticide residues in foods using acetonitrile with magnesium sulfate and chloroform. **J. Chromatogr. A**, v. 1218, n. 11, p. 1429-1436, 2011.
62. LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. **J. Chromat. A**, v. 902, n. 1, p. 17-63, 2000.
63. LORDEL, S. **Synthèse et caractérisation de polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction sélective de résidus d'explosifs pour le développement de dispositifs de terrain**. 2011. Tese (Doutorado), Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, Paris – França.
64. MACEDO, A. N. **Desenvolvimento de métodos analíticos visando atender aos princípios da química verde na análise de resíduos de medicamentos veterinários em leite bovino**. 2012. Tese (Doutorado) -. Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos.
65. MALGHANI, S.; CHATTERJEE, N.; YU, H.; LUO, Z. Isolation and identification of profenofos degrading bacteria. **Braz. J. Microbiol.**, v. 40, n. 4, p. 893-900, 2009.
66. MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers: new molecular recognition materials for selective solid-phase extraction of organic compounds, **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 370, n. 7, p. 795-802, 2001.
67. MARTINS, M. N.; SILVA, T. F. Electron accelerators: History, applications, and perspectives. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 95, p. 78–85, 2014.

68. MAYES, A. G.; WHITCOMBE, M. J. Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers. **Adv. Drug. Deliver. Rev.**, v. 57, p. 1742- 1778, 2005.
69. MILLER, R, B. **Electronic irradiation of foods: an introduction to the technology**. New York: Springer, 2005.
70. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PÉCUARIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Presidência da República Casa Civil Subchefia para Assuntos Jurídicos**; Decreto nº 4.074 de 2002. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/CCIVIL_03/decreto/2002/D4074.htm>. Acesso em: 18 jan. 2015.
71. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA, **Secretaria de Defesa Agropecuária - Análise de Resíduos e Contaminantes em Alimentos**, 2011.
72. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA, **Secretaria de Defesa Agropecuária**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm>. Acesso em: 21 jun. 2012.
73. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA, **Agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/mercado-interno/agrotoxicos>>. Acesso em: 03 jan. 2015.
74. MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO – MDA. **O Brasil é o maior consumidor e produtor de agrotóxicos do mundo desde 2009**. Disponível em: <<http://www.mda.gov.br/portal/noticias/18.02.2012>>. Acesso em: 15 dez. 2013.
75. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – MMA, **Agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>>. Acesso em: 20 fev. 2015.
76. MITTAL, K. C. HIGH power electron accelerators for radiation processing and its safety aspects. **Indian J. Pure Ap. Phy.**, v. 50, n. 11, p. 772-775, 2012.
77. MOREHOUSE, K. M. Food irradiation - US Regulatory Considerations. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 63, p. 281–284, 2002.
78. MUJAHID, A.; LIEBERZEIT, P. A.; DICKERT, F. L. **Materials**, v. 3, p. 2196-2217, 2010.
79. N E. 15662, Foods of plant origin – **Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean up by dispersive SPE – QuEChERS-method**. 2008.

80. NAVARROA, V.; ROMEROA, M. G.; SÁNCHEZ, J. F. F.; CORMACK, P. A.; SEGURA-CARRETERO, A.; GUTIÉRREZ, A. F. Synthesis of caffeic acid molecularly imprinted polymer microspheres and high-performance liquid chromatography evaluation of their sorption properties. **J. Chromatogr. A**, v. 1218, n. 41, p. 7289-7296, 2011.
81. PATNAIK, P. **A comprehensive guide to the hazardous properties of chemical substances**. 3rd ed. Wiley, p. 1059, 2007.
82. PAYÁ, P.; ANASTASSIADES, M.; MACK, D.; SIGALOVA, I.; TASDELEN, B.; OLIVA, J.; BARBA, A. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometry detection. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 389, n. 6, p. 1697-1714, 2007.
83. PICHON, V. Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers. **J. Chromatogr. A**, v. 1152, n. 1-2, p. 41-53, 2007.
84. PUOCI, F.; CIRILLO, G.; CURCIO, M.; CURCIO, O. I.; IEMMA, F.; PICCI, N. Molecularly imprinted polymers in drug delivery: state of art and future perspectives. **Expert Opin. Drug Del.**, v. 8, n. 10, p. 1379-1393, 2011.
85. LIU, Q. Y.; LI, W. Y.; HE, X. W.; CHEN, L. X.; ZHANG, Y. K. Study of recognition property of molecularly imprinted bovine hemoglobin on surface-modified silica gel. **Acta Chim. Sinica**, v. 66, n. 1, p. 56-62, 2008.
86. QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quím. Nova**, v. 24, p. 68-76, 2001.
87. RAGNARSDOTTIR, K. V. Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides. **J. Geol. Soc.**, v. 157, n. 4, p. 859-876, 2000.
88. REDDY, N. C.; RAO, V. Biological response of earthworm, *Eisenia foetida* (savigny) to an organophosphorus pesticide, profenofos. **Ecotox. Environ. Safe**, v. 71, n. 2, p. 574-582, 2008.
89. RESMINI, M. Molecularly imprinted polymers as biomimetic catalysts. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 402, n. 10, p. 3021-3026, 2012.
90. RILEY, P. A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 65, p. 27-33, 1994.
91. RIVADENEIRA, R.; MOREIRA, R.; KIM, J.; CASTELL-PEREZ, M. E. Dose mapping of complex-shaped foods using electron-beam accelerators. **Food Control**, v. 18, n. 10, p. 1223-1234, 2007.

92. ROBERTS, P. B. Food irradiation is safe: Half a century of studies. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 105, p. 78-82, 2014.
93. RYAN, T. R.; POSTON, J. W. **A Half Century of Health Physics**. Maryland: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
94. SADEGHI, S.; JAHANI, M. Solid-Phase Extraction of Florfenicol from Meat Samples by a Newly Synthesized Surface Molecularly Imprinted Sol-Gel Polymer. **Food Anal. Method.**, v. 7, n. 10, p. 2084-2094, 2014.
95. SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C. L.; COSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Quím. Nova**, v. 30, n. 1, 2007.
96. SHIBAMOTO, T.; BJELDANES, L. F. **Introduction to food toxicology**, 2. ed. New York: Academic Press, 2014.
97. SILVA, N. A. **Biodegradação dos pesticidas clorpirifós, metil paration e profenofós por fungos de origem marinha**. 2013. Dissertação (Mestrado), Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos.
98. SILVA, R. G. C. **Materiais sorventes Impressos molecularmente preparados processos por sol-gel**. 2009. Tese (Doutorado), Instituto de Química, Universidade de Campinas, Campinas.
99. SILVA, R. G. C.; AUGUSTO, F. Sol-gel molecular imprinted ormosil for solid-phase extraction of methyxanthines. **J. Chromatogr. A**, v. 1114, p. 216-223, 2006.
100. SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA - SINDAG. Biblioteca-Dados. Disponível em: <<http://www.Sindag.com.br>>. Acesso em: 10 nov. 2010.
101. SINDICATO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS - SINDAG. **Dados de produção e consumo de agrotóxicos**. Disponível em: <www.sindag.com.br>. Acesso em: 29 de dez. de 2011.
102. SINGH, B. K.; WALKER, A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 30, p. 428-471, 2006.
103. ŠKRBIĆ, B.; PREDOJEVIĆ, Z. Levels of organochlorine pesticides in crops and related products from Vojvodina, Serbia: Estimated dietary intake, **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 54, n. 4, p. 628-636, 2008.
104. SOUSA, M. D.; BARBOSA, C. M. Polímeros com capacidade de reconhecimento molecular no controle da liberação de fármacos. Parte I: síntese e caracterização. **Quím. nova**, v. 32, p. 1609-1619, 2009.

105. SUN, H.; YAN, H.; QIAO, F.; ROW, K. H. Molecularly imprinted polymers for Solid Phase Extraction. **Chromatographia**, v. 64, p. 625-634, 2006.
106. SWARNAM, T. P.; VELMURUGAN, A. Pesticide residues in vegetable samples from the Andaman Islands, India. **Environ. Monit. Assess.**, v. 185, p. 6119–6127, 2013.
107. TADEO, J. L.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; PÉREZ, R. A.; FERNÁNDEZ, M. D. Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables. **J. Chromatogr. A**, v. 882, n. 1-2, p. 175-191, 2000.
108. TAMAYO, F. G.; TURIEL, E.; MARTIN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: recent developments and future trends. **J. Chromatogr. A**, v. 1152, n. 1-2, p. 32-40, 2007.
109. TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. P.; KUBOTA, T. L. T. Polímeros Biomiméticos em Química Analítica. Parte 1: Preparo e Aplicações de MIP (Molecularly Imprinted Polymers) em Técnicas de Extração e Separação, **Quím. Nova**, v. 28, n. 6, p. 1076-1086, 2005.
110. THIBERT, V.; LEGEAY, P.; CHAPUISHUGON, F.; PICHON, V. Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymers for the selective extraction of cocaine and its metabolite benzoylecgonine from hair extract before LC-MS analysis. **Talanta**, v. 88, p. 412- 419, 2012.
111. THURMAN, E. M.; SNAVELY, K. Advances in solid-phase extraction disks for environmental chemistry. **TRAC-Trend Anal. Chem.**, v. 19, n. 1, 2000.
112. TOAN, P. V.; SEBESVARI, Z.; BLÄSING, M.; ROSENDAHL, I.; RENAUD, F. G. Pesticide management and their residues in sediments and surface and drinking water in the Mekong Delta, **Vietnam. Sci Total Environ.**, v. 452-453, p. 28–39, 2013.
113. TRITSCH, G. L. Food irradiation. **Nutrition**, v.16, n. 7-8, p. 698-701, 2000.
114. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – U.S. EPA. **About pesticides**, 2012. Disponível em: <<http://www.gov/pesticides/about/types.htm>>. Acesso em: 15 dez. 2013.
115. WARE, G.; WHITANE, D. **The Pesticide Book**, 6th Edition, Meister Publication, 2004.
116. WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Safety and nutritional adequacy of irradiated food**. Geneva, 1994.
117. WILKOWSKA, A.; BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. **Food Chem.**, v. 125, n. 3, p. 803–812, 2011.

118. XU, Z. L.; SHEN, Y. D.; ZHENG, W. X.; BEIER, R. C.; XIE, G. M.; DONG, J. X.; YANG, J. Y.; WANG, H.; LEI, H. T.; SHE, Z. G.; SUN, Y. M. Broad-specificity immunoassay for O, O-diethyl organophosphorus pesticides: application of molecular modeling to improve assay sensitivity and study antibody recognition. ***Anal. Chem.***, v. 82, p. 9314–9321, 2010.
119. YAN, H.; HO ROW, K. Characteristic and Sythetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer. ***Int. J. Mol. Sci.***, v. 7, p. 155-178, 2006.
120. YAN, M.; Ramström, O. Molecularly Imprinted Materials-Science and Technology. ***Marcel Dekker***, New York, 2005.
121. YANG, Z.; WANG, H. Y.; WANG, W.; QI, W. Y.; YUE, L.; YE, Q. F. Effect of 10 MeV E-beam irradiation combined with vacuum-packaging on the shelf life of Atlantic salmon fillets during storage at 4 degrees C. ***Food Chem.***, v. 145, p. 535-541, 2014.
122. YE, L.; MOSBACH, K. The techniqe of molecular imprinting – principle, state of the art, and future aspects. ***J. Inclusion. Phenom. Macrocyclic. Chem.***, v. 41; n. 1-4, p. 107-113, 2001.
123. ZHANG, L.; SHAOWEN LIU, S.; CUI, X.; PAN, C.; ZHANG, A.; CHEN, F. A review of sample preparation methods for the pesticide residue analysis in foods. ***Cent. Eur. J. Chem.***, v. 10, n. 3, p. 900-925, 2012.

CAPÍTULO II

DEGRADAÇÃO DE PROFENOFÓS EM SOLUÇÃO AQUOSA POR FEIXE DE ELÉTRONS

Devido a ampliação da produção agrícola no Brasil, o consumo de pesticidas tem aumentado para melhorar o rendimento de culturas agrícolas. O profenofós é um inseticida e acaricida amplamente utilizado no Brasil para o controle de pragas. Com o intuito de realizar a clivagem da molécula de profenofós para obter novos produtos menos tóxicos, muitas tecnologias podem ser exploradas, uma delas é a irradiação. A irradiação é um processo utilizado em todo o mundo e recomendado por muitos órgãos de saúde para a preservação de alimentos. Além disso, a irradiação de alimentos tem sido aplicada para o tratamento de vários produtos agrícolas para redução de agentes patogênicos. O objetivo deste capítulo foi avaliar o efeito de feixe de elétrons em soluções aquosas de profenofós e identificar os produtos de degradação. As amostras foram irradiadas com feixe de elétrons utilizando aparelho Rhodotron nas doses absorvidas de 0 (controle); 4,6; 11,7 e 31,6 kGy. A degradação da solução aquosa de profenofós e os subprodutos formados depois do tratamento de irradiação foram qualitativamente determinados com cromatógrafo gasoso acopladoem um espectrômetro de massa (GC-MS). Tratamento com feixe de elétrons na dose de radiação de 31,6 kGy promoveu redução de 93,40 % na solução profenofós e acarretou a clivagem da molécula formando um único produto de degradação.

1. INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos organofosforados são amplamente difundidos na agricultura como inseticidas agrícolas, aplicados em frutas e legumes para aumentar a produção de alimentos, prevenir, destruir, repelir ou mitigar pragas (U.S. EPA, 2009). Um exemplo dessa classe de pesticidas é o profenofós.

O profenofós (O-(4-bromo-2-clorofenil) O-etil S-propilfosforotioato) é largamente utilizado no Brasil, desenvolvido para controlar as estirpes de pragas e insetos nocivos e desta forma aumentar a produtividade das culturas. Contudo o seu uso é proibido dentro da Comunidade Européia segundo a base de dados pesticidas da União Européia (EU Pesticides database, 2015).

Segundo a OMS o profenofós foi classificado como pesticida moderadamente perigoso (WHO, 2004). Para amenizar o efeito do profenofós, alguns estudos foram desenvolvidos com o intuito de degradar o composto utilizando diversas metodologias (Akbar et al., 2012; Malghani et al., 2009; Salunkhe et al., 2013; Siripattanakul-Ratpukdi et al., 2015; Petrick, 2013), como por exemplo o processo de radiação ionizante.

A irradiação é um método empregado para uma variedade de produtos alimentares, sendo viável, eficaz e favorável ao meio ambiente, aumenta a vida útil dos alimentos perecíveis frescos, tem-se mostrado uma ferramenta eficaz para eliminar patógenos (Farkas e Farkas, 2011). A irradiação de alimentos é um processo em que o alimento é exposto a radiações ionizantes, tais como feixe de elétrons de alta energia, raios X produzidos por aceleradores de elétrons, ou radiação gama emitida a partir do radioisótopo ^{60}Co (Farkas, 2006).

As soluções aquosas de pesticidas podem ser obtidas pela extração líquido-líquido (LLE). A LLE baseia na transferência de um soluto de uma fase líquida para outra de acordo com a sua solubilidade (Blackadder e Nedderman, 2004). A determinação de pesticidas presentes em soluções aquosas pode ser quantificada por cromatografia gasosa (GC) acoplada a diferentes detectores, como espectrometria de massa (MS) para a separação e quantificação de resíduos de pesticidas nas amostras de alimentos, respectivamente (Andreu et al., 2004; Leandro et al., 2006; Wang et al., 2005).

Neste capítulo o objetivo foi investigar o efeito de doses absorvidas na degradação do pesticida profenofós em solução aquosa, além de identificar e analisar os produtos de degradação por cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa (GC-MS).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Padrões e Reagentes

O profenofós ($C_{11}H_{15}BrClO_3PS$, 96,9 %) e a atrazina ($C_8H_{14}ClN_5$, 98,8 %), foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A estrutura química do profenofós esta representada na FIG. 2.1.

FIGURA 2.1 - Fórmula molecular do profenofós

Os solventes orgânicos (para grau pesticida) utilizados para a dissolução e extração foram a acetonitrila e acetato de etila, respectivamente. Ambos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) com características para o uso com pesticidas.

Os experimentos foram realizados com água purificada, utilizando um sistema de Sinergia Milli-Q (Millipore, Molsheim, França).

2.2 Métodos

2.2.1 Preparação das amostras

As soluções de padrões de profenofós foram diluídas em acetonitrila. Foram transferidos 84 μ L de solução de 1 mg/mL (1001,14 ppm) de profenofós em acetonitrila para frascos esterilizados com volume de 20 mL. Em seguida, o conteúdo do tubo foi diluído com água purificada obtendo uma concentração final

de 27,27 ppm e volume total de 3084 mL da solução aquosa profenofós. Para cada dose de irradiação foram preparados seis tubos.

Os frascos utilizados neste experimento foram esterilizados anteriormente em um forno à 400 °C durante oito horas, lacrados com folha de alumínio e septos de silicone à base de teflon e identificadas com as respectivas doses de radiação.

2.2.2 Irradiação

As soluções aquosas de profenofós foram irradiadas com feixe de elétrons em acelerador Rhodotron E-beam (IBA, Louvainla Neuve, Belgique), instalado em Bruchsal, na Alemanha, com uma corrente de 15 mA, 160 centímetros de largura de digitalização e 10 MeV de energia. As doses de radiação aplicadas foram 0 (controle); 4,6; 11,7 e 31,6 kGy.

As doses absorvidas foram monitoradas com dosímetros radiocrômicos FWT 60.00 (Far West Technology, Goleta, CA), previamente calibrados com dosímetros de alanina (Aérial, Illkirch, França) (Kuntz et al., 1996).

A uniformidade de dose foi de aproximadamente 10 % dentro da amostra e esta foi alcançada pelo uso de uma lâmina de espalhamento de cobre de 100 µm de espessura (Kuntz et al., 1991).

Durante a irradiação as condições padrões de temperatura e pressão utilizadas foram de 25 °C e 1 atm, respectivamente.

2.2.3 Procedimento de extração

Após a irradiação, o volume da amostra contida no tubo ensaio foi transferido para outro tubo de ensaio previamente identificado para realizar o processo de extração líquido-líquido da solução aquosa de profenofós.

Em cada tubo foi inserido 84 µL de solução de atrazina (1mg/mL de atrazina dissolvido em acetonitrila) como padrão interno foi adicionado antes de iniciar o procedimento de extração. O profenofós foi extraído com acetato de etila (3 x 3 mL), pois distribuição do soluto entre duas fases líquidas possui maior afinidade com reagente composto de éster do que com a água.

Os extratos orgânicos foram evaporados até secar sob fluxo suave de gás nitrogênio. Após o processo de secagem, adicionou-se 1 mL de acetato de etila em cada tubo. As amostras foram cuidadosamente transferidas com pipeta Pasteur para um tubo de vidro (*vial* de volume de 2 mL e dimensões 12 x 32 mm) e a solução de profenofós foi analisada em GC-MS.

2.2.4 Análise por GC-MS

As análises de GC-MS foram realizadas num sistema de cromatografia Varian Star 3400 acoplado a um SPI injetor na coluna acoplada a um detector de massa SATURNO Varian 2000 (Varian, França).

O controle instrumental, aquisição e processamento de dados foram analisados com o software Varian Saturn WS, versão 6.9.1. As amostras foram separadas com uma coluna VF-5ms capilar (60 m, 0,25 mm de diâmetro interno, Varian, França).

O volume de injeção foi de 1,0 µL. O programa de temperatura do GC foi realizado nas seguintes condições: 80 °C (inicial), elevando-se a 280 °C durante 1 min a 5 °C/min, com um total de 40 min de análise.

O gás transportador foi o hélio (com pureza de 99,9995 %), a velocidade do fluxo foi de 1 mL/min. Espectros de massa foram obtidos por ionização no modo de impacto eletrônico (EI) a 70 eV e com m/z 40-600. Os dados quantitativos foram obtidos usando análise de monitorização iônica selecionada (SIM).

2.2.5 Fator de resposta relativa e validação da metodologia

O fator de resposta relativa (RRF) é um parâmetro analítico utilizado em procedimentos cromatográficos como uma medida da resposta relativa aplicado como instrumento de detecção do profenofós comparado com a atrazina (padrão interno).

Os valores de RRF foram determinados com base nos valores da área do pico do espectro de diferentes concentrações (5, 10, 20, 40, 70 e 90 ppm) de profenofós e atrazina pelo monitoramento de íons selecionados (SIM). Os

experimentos foram realizados em triplicata. Os analitos foram quantificados com o auxílio da seguinte equação (Julien-David et al., 2014):

$$n_c = \frac{n_{is} A_c}{RRF_c A_{is}} \quad (2.1)$$

Sendo: A_c e A_{is} a área recuperada da solução de profenofós e da solução de atrazina, respectivamente.

O RRF_c é o fator de resposta relativa, e RRF_{is} representa o fator de resposta do padrão interno. O cálculo de RRF_c foi obtido com a equação:

$$RRF_c = \frac{n_{is} A_c}{n_c A_{is}} \quad (2.2)$$

As abreviações n_c e n_{is} representam o número de mols do profenofós e o padrão interno adicionado na amostra, respectivamente (Julien-David et al., 2014).

O limite de detecção (LoD) foi definido como a menor concentração do analito que apresentasse uma relação sinal/ruído (S/N) de 3. O limite de quantificação (LoQ) foi definido como a menor concentração do analito que apresentasse uma razão sinal/ruído (S/N) de 10.

A linearidade foi testada por soluções de profenofós com diferentes concentrações variando de 5,0 até 90 µg/mL (análises em triplicata). Em todas as concentrações foram adicionadas 84 µg/mL de atrazina em acetonitrila e a curva de calibração foi construída.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na extração líquido-líquido foi observado um sistema bifásico, ou seja, houve a separação do composto orgânico e da água. A transferência do profenofós da fase aquosa para a fase orgânica ocorreu de acordo com a sua solubilidade.

O profenofós possui pouca solubilidade em água, de 28 mg/L à 20 °C (FAO, 1998), porém é completamente solúvel em solventes orgânicos (etanol, acetona, tolueno, acetato de etila, n-octanol e n-hexano) a 25 °C (U.S. EPA, 2006). As soluções aquosas de profenofós foram extraídas com acetato de etila.

3.1 Degradação de profenofós

O feixe de elétrons tem baixo poder de penetração e pode ser empregado em diferentes materiais e sua eficiência depende da espessura do produto, da tensão de aceleração e da densidade do material processado (Drobny, 2002; Hui, 2006; Miller, 2005). Para facilitar a penetração do feixe de elétrons foram preparados 3084 µL de solução de profenofós inseridos em diferentes frascos. A espessura correspondente ao volume preparado foi de 7,0 mm. A fim de evitar a interação da embalagem com o processo de irradiação, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro (20 mL) para não interferir e/ou alterar as características da solução de profenofós após a radiação ionizante.

A energia do acelerador também é outro fator importante, pois os aceleradores com energia até 10 MeVs não desenvolvem radioatividade residual.

A quantificação da degradação das soluções aquosas de profenofós processadas por feixe de elétrons foi obtida através do cálculo do RRF. A atrazina foi utilizada como padrão interno para melhorar a exatidão e a precisão da análise quantitativa da solução de profenofós. Zamy e colaboradores (2004) utilizaram a atrazina como padrão interno para a quantificação de três pesticidas organofosforados, entre eles o profenofós.

Os tempos de retenção e os íons selecionados para identificação e quantificação do profenofós, encontram-se na TAB. 2.1. O fator de resposta

relativa de profenofós foi determinado com o modo SIM em relação ao padrão interno.

TABELA 2.1 – Valores de peso molecular (Mw), fatores relativos de resposta (RRF), tempos de retenção (Tr) de profenofós e atrazina

	Mw (g/mol)	Tr (min)	RRF	SIM ions (abundância relativa, %)	
				Identificação	Quantificação
Atrazina	215,19	23,06	1,0	58 (17,5 %); 215,3 (39 %); 216,2 (100 %); 217,1 (21 %)	215
Profenofós	373,63	31,39	0,64±0,05	41,2 (17,5 %); 63,2 (17,6 %); 97,2 (25 %); 268,8 (13 %); 337,2 (75 %); 339,2 (100 %); 374,4 (15 %)	337+339

Os resultados mostrados na FIG. 2.2 indicaram que o aumento da dose de radiação absorvida promoveu uma diminuição da concentração profenofós. A degradação do profenofós na concentração inicial de 84 ppm com porcentagens de remoção de 0; 66,12; 87,41 e 93,40 % correspondentes a doses absorvidas de 0 (controle); 4,6; 11,7 e 31,6 kGy, respectivamente.

FIGURA 2.2 - Curva de degradação de profenofós na água purificada em função da dose de irradiação. Cada ponto representa a média ± erro padrão

Referente à análise quantitativa, a linearidade das repostas dos padrões de profenofós foi construída uma curva de calibração representada na TAB. 2.2. O coeficiente de correlação (R^2) apresentou valor de 0,997, o limite de detecção (LoD) e o limite de quantificação (LoQ) foram de 2,25 e 6,74 ppm, respectivamente.

TABELA 2.2 - Parâmetros analíticos de cromatografia gasosa para profenofós

Analito	Análise linear		Limite de detecção ($\mu\text{g/mL}$)	Limite de Quantificação ($\mu\text{g/mL}$)
	Curva de Calibração	R^2		
Profenofós	$y = 2,0511x$	0,997	2,25	6,74

As curvas de calibração foram obtidas plotando as áreas de pico (y) vs concentração (x)

3.2 Degradação e subprodutos de profenofós formados após a uso da radiação ionizante

O perfil cromatográfico da solução aquosa de profenofós irradiada na dose de 11,7 kGy (FIG. 2.3), foi registrado a presença de um produto de degração. Os picos cromatográficos estão representados na seguinte ordem de eluição: (1) atrazina, (2) produto de degradação e (3) profenofós.

FIGURA 2.3 - Cromatograma de solução profenofós irradiados com dose de 11,7 kGy (pico 3), padrão interno (pico 1) e produto de degradação (picos 2)

Por meio do espectro de massa observou-se o íon de m/z de 339 $[M]^+$ para molécula de profenofós (FIG. 2.4).

FIGURA 2.4.- Espectro de massa do obtido pela análise por GC-MS do profenofós com m/z de 339 $[M]^+$

A análise por espectrometria de massas do produto de degradação, que possui tempo de retenção de 25,82 min, com ionização em modo positivo, mostrou o valor da razão m/z igual 259,1, ilustrado na FIG. 2.5.

FIGURA 2.5 - Espectro de massa correspondente ao subproduto de profenofós com m/z 259,1 obtido por irradiação

A clivagem da molécula de profenofós por irradiação promoveu a degradação radiolítica e formação de um produto de degradação que foram identificados utilizando o GC-MS com ionização EI^+ (FIG. 2.3). O subproduto da degradação da solução de profenofós por radiação ionizante (FIG. 2.6) foi observado nas doses absorvidas de 4,6; 11,7 e 31,6 kGy.

FIGURA 2.6 - Estrutura química da degradação potencial do principal subproduto de profenofós por acelerador de elétrons

Profenofós é caracterizado por apresentar íons moleculares fortes e íons característicos pela presença do grupo fosforotioato, cloro e bromo ligado no anel de benzeno. A maioria dos compostos químicos que contêm o anel aromático em sua estrutura tem intensidade significativa devido a estabilidade molecular (Hong J. et al., 2000).

Na degradação radiolítica, o principal subproduto detectado no pico 2 (FIG. 2.3) foi formado a partir da clivagem das ligações de bromo e de cloro do anel aromático presente na fórmula do profenofós. Sua quantificação esta representada na FIG. 2.7.

O bromo encontrado na natureza possui uma mistura isotópica de 50:50 com massas atômicas de 79 e 81 amu e picos de íons característicos. Logo, a eliminação do átomo de bromo e do cloro no espectrograma de massa, gerou íons isotópicos fragmentados com m/z de 259,1 [M-Br-Cl]⁺.

O tempo de retenção do produto de degradação foi 25,82 min e a fórmula empírica pode ser representada por C₁₁H₁₅O₃PS.

FIGURA 2.7- Produto de degradação profenofós em diferentes doses de irradiação

Os resultados mostraram que as soluções aquosas de profenofós foram degradadas quando submetidos em diferentes doses de radiação. A remoção do profenofós em soluções aquosas e produtos de degradação, em função da dose de irradiação são mostrados na FIG. 2.8.

FIGURA 2.8 - Degradação de profenofós e subprodutos formados em diferentes doses de irradiação

A maior formação de produto de profenofós foi amostrada na dose absorvida de 4,6 kGy. A degradação de soluções aquosas de compostos de profenofós por aceleradores de elétrons foi possível, pois a irradiação em contato com a matéria produzem moléculas ionizadas, excitadas, átomos H, radicais, íons OH e moléculas H_2O (H_2 e peróxido de hidrogênio H_2O_2) e reduz as condições

para as reações de elétron hidratado (eeq^-) (Caer, 2011). Devido a essas reações a produção de OH aumentou, favorecendo as reações de degradação de produtos oxidativos que conduzem a degradação da molécula investigada (Basfar 2005; Caer, 2011).

Ismail e colaboradores (2013) analisaram diferentes soluções aquosas de cloropirifos (200-1000 $\mu\text{g/L}$) e submeteram ao processo de radiação (^{60}Co) com as doses absorvidas de 30 a 575 Gy. Os resultados mostraram que houve uma degradação de 500 $\mu\text{g/L}$ para a solução na dose absorvida de 575 Gy. Além disso, o radical livre OH oxidativo foi o mais importante fator para a degradação de cloropirifos que analisado pelo método de SPME-GC-ECD.

Zamy et. al (2004) investigaram a transformação fotoquímica de três pesticidas organofosforados. O estudo envolveu soluções aquosas profenofós e também águas do rio Capot (Martinica). Os autores verificaram a degradação do pesticida utilizando luz monocromática a 253,7 nm e luz policromática maior que 285 nm. O esquema geral da formação dos subprodutos de profenofós está representado na FIG. 2.9. As experiências foram realizadas utilizando HPLC-MS e CG/MS e identificaram sete produtos de degradação.

FIGURA 2.9 - Adaptado de Zamy et. al (2004): Estruturas dos produtos de degradação do profenofós mediante irradiação policromática ($\lambda > 285$ nm) em solução aquosa. As Letras A, B, C, D, E e F indicam os diferentes caminhos, na qual ocorreram clivagem da molécula

4. CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que o profenofós em solução aquosa pode ser efetivamente degradado por irradiação de feixe de elétrons. O aumento das doses de radiação absorvidas promoveram uma diminuição na concentração profenofós. Com base na análise por GC-MS foi detectado um novo produto resultado da degradação do profenofós. As doses de 4,6 kGy e 31,6 kGy promoveram a redução de 66,12 % e 93,40 %, respectivamente, do pesticida estudado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGROFIT - **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit-cons/principal-agrofit-cons>>. Acesso em: 10 jan. 2015.
2. ANDREU, V.; PICO, Y. Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. **Trends Anal. Chem.**, v. 23, p. 10–11, 2004.
3. AKBAR, M. F.; HAQ, M. A.; YASMIN, N.; KHAN, M. F. U. Degradation Analysis of Some Synthetic and Bio-Insecticides Sprayed on Okra Crop Using HPLC. **J. Chem. Soc. Pakistan**, v. 34, n. 2, p. 306-311, 2012.
4. BASFAR, A. A.; KHAN, H. M.; AL-SHAHRANI, A. A.; COPER, W. J. Radiation induced decomposition of methyl tert-butyl ether in water in presence of chloroform: kinetic modeling. **Water Res.**, v. 39, p. 2085-2095, 2005.
5. BLACKADDER, D. A.; NEDDERMAN, R. M. **Manual de Operações Unitárias**. São Paulo: Hemus Editora Ltda, 2004.
6. CAËR, S. Review: Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H₂ Production under Ionizing Radiation. **Water**. v. 3, p. 235-253, 2011.
7. DROBNY, J. G. **Radiation Technology for Polymers**, 1st ed. New York: CRC Press, 2002.
8. EU PESTICIDES DATABASE - EUROPEAN COMMISSION. Disponível em: <<http://ec.europa.eu>>. Acesso em: 10 jan. 2015.
9. FARKAS, J. Irradiation for better foods. **Trends Food Sci. Tech.**, v. 17, p. 148–152, 2006.
10. FARKAS, J.; FARKAS, C. M. History and future of food irradiation. **Trends in Food Sci. Tech.**, v. 22, p. 121–126, 2011.
11. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, Specifications for Plant Protection Products Profenofos (AGP:CP/359), 1998.
12. HONG, J.; KIM, D. G.; PAENG, K. J. Electron Impact Fragmentations of Chlorinated Organophosphorus Pesticides, **Bull. Korean Chem. Soc.**, v. 21, p. 785-792, 2000.
13. HUI, Y. H. **Handbook of Food Science, Technology, and Engineering**, Volume 3, New York: CRC- Taylor & Francis, 2006.

14. ISMAIL, M.; KHAN, H. M.; SAYED, M.; Cooper W. J. Advanced oxidation for the treatment of chlorpyrifos in aqueous solution. **Chemosphere**, v. 93, p. 645–651, 2013.
15. JULIEN-DAVID, D.; ZHAO, M.; GEOFFROY, P.; MIESCH, M.; RAUL, F.; AOUDÉ-WERNER, D.; ENNAHAR, S.; MARCHIONI, E. Analysis of sitosteryl oleate esters in phytosterols esters enriched foods by HPLC–ESI-MS². **Steroids**, v. 84, p. 84–91. 2014.
16. KUNTZ, F.; PABST, J. Y.; DELPECH, J. P.; WAGNER, J. P.; MARCHIONI, E. Alanine-ESR in vivo dosimetry. A feasibility study and possible applications. **Appl. Radiat. Isotopes**, v. 47, p. 1183–1188, 1996.
17. KUNTZ, F.; MARCHIONI, E.; STRASSER, A. Homogénéisation de la dose déposée dans un produit ionisé aux électrons accélérés In: International Symposium on High Dose Dosimetry for Radiation Processing, Nov 5-9, 1990, Vienna. Proceedings. IAEA (International Atomic Energy Agency), Report IAEA SM 314/30, p. 479-488, 1991.
18. LEANDRO, C. C.; HANCOCK, P.; FUSSELL, R. J.; KELLY, B. J. Comparison of ultra-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of priority pesticides in baby foods by tandem quadrupole mass spectrometry. **J. Chrom. A**, v. 1103, p. 94-101, 2006.
19. MALGHANI, S.; CHATTERJEE, N.; HU, X. Y.; ZEJIAO, L. Isolation and characterization of a profenofos degrading bacterium. **J. Environ. Mental Sci. China**, v. 21, n. 11, p.1591-1597, 2009.
20. MILLER, R. B. **Electronic irradiation of foods: an introduction to the technology**. New York: Springer, 2005.
21. PETRICK, L. M.; SABACH, S.; DUBOWSKI, Y. Degradation of VX Surrogate Profenofos on Surfaces via in Situ Photo-oxidation. **Environ. Sci. Technol.**, v. 47, n. 15, p. 8751-8758, 2013.
22. SALUNKHE, V. P.; SAWANT, I. S.; BANERJEE, K.; RAJGURU, Y. R.; WADKAR, P. N.; OULKAR, D. P.; NAIK, D. G.; SAWANT, S. D. Biodegradation of Profenofos by *Bacillus subtilis* Isolated from Grapevines (*Vitis vinifera*). **J. Agr. Food Chem.**, v. 61, n. 30, p. 7195-7202, 2013.
23. SIRIPATTANAKUL-RATPUKDI, S.; VANGNAI, A. S.; SANGTHEAN, P.; SINGKIBUT, S. Profenofos insecticide degradation by novel microbial consortium and isolates enriched from contaminated chili farm soil. **Environ. Sci. Pollut. R.**, v. 22, n. 1, p. 311-319, 2015.
24. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – U.S. EPA. **Office of Pesticide Programs**, 2006.

25. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - US EPA. **Types of pesticides.** 2009. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>>. Acesso em: 20 abr. 2014.
26. ZAMY, C.; MAZELLIER, P.; LEGUBE, B. Phototransformation of selected organophosphorus pesticides in dilute aqueous solutions. **Water Res.**, v. 38, p. 2305–2314, 2004.
27. WANG, J.; CHEUNG, W.; GRANT, D. Determination of Pesticides in Apple-Based Infant Foods Using Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **J. Agr. Food Chem.**, v. 53, p. 528–537. 2005.
28. WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. 2004. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification. Geneva.

CAPÍTULO III

DETERMINAÇÃO DE PROFENOFÓS EM ERVILHAS IRRADIADAS PROCESSADOS POR FEIXE DE ELÉTRONS UTILIZANDO O MÉTODO QuEChERS PARA EXTRAÇÃO DO AGROTÓXICO

Amostras de ervilhas (*Pisum sativum*) foram inoculadas com soluções de profenofós diluídas em etanol e submetidas o processo de irradiação. O feixe de elétrons foi gerado por um acelerador Rhodotron com 10 MeV de energia e aplicadas as doses absorvidas de 0 (controle); 4,5; 12,2 e 30,4 kGy. O pesticida foi extraído utilizando o método analítico QuEChERS (do inglês: *Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe*). As amostras foram trituradas e extraídas inicialmente com acetonitrila, seguida pelos sais de QuEChERS e foi adicionado sulfato de magnésio anidro (MgSO₄). A amostra foi percolada em uma coluna de leito fixo SPE (extração de fase sólida) constituída de dupla camada de carbono e uma camada de aminopropil (NH₂). O eluente foi analisado em cromatografo em fase gasosa acoplado com espectrometria de massa *tandem* (GC-MS/MS). Neste contexto, este capítulo teve como objetivo determinar a degradação do profenofós inoculados em ervilhas que foram submetidas a radiação ionizante por feixe de elétrons utilizando como método de extração o QuEChERS. Os resultados mostraram que o tratamento com feixe de elétrons submetidos à dose de 30,4 kGy promoveu uma redução de 44,50 % de profenofós presentes em ervilha.

1. INTRODUÇÃO

A ervilha (*Pisum sativum* L.), originária do Oriente Médio, é considerada um dos vegetais mais antigos cultivados pelo homem no mundo, juntamente com lentilha (*L. Culinaris Medik.*), grão de bico (*Cicer arietinum* L.), ervilhaca amarga ou marroíço (*Vicia ervilia* (L.) Willd.) e outros cereais (Zohary e Hopf 2000).

A ervilha é consumida de diversas formas como: grãos verdes, fresca, seca, congelada e enlatada. Além disso, possui grande importância na nutrição humana por ser fonte de proteína, vitaminas do complexo B, principalmente tiamina, riboflavina, niacina, além de minerais como ferro, fósforo, cálcio e potássio (Shia et al., 2014). Cultivada em várias partes do mundo, principalmente em regiões de clima temperado, é um vegetal muito tolerante a baixas temperaturas e para controlar pragas que causam danos às plantações são utilizados agrotóxicos em seu cultivo. Dentre os diversos tipos de agrotóxicos aplicados na agricultura está o grupo dos organofosforados (Bruzzoniti et al., 2014).

O profenofós é amplamente utilizados pelos agricultores para o controle de fungos, infestações de insetos e pragas em diversas culturas agrícolas (Ismail e Ngan, 2005; Rajesh e Pilo, 2009).

O regulamento que fixa os limites máximos de pesticidas admissíveis nos alimentos é definido pelo Limite Máximo de Resíduos (LMR) (Nasreddine e Parent-Massin, 2002). No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (AGROFIT, 2015) estabeleceu o LMR de 0,1 mg/g de profenofós em ervilhas. Por outro lado, a Comunidade Européia restringe o uso de pesticidas organofosforados em suas lavouras (EU Pesticides database, 2015). Uma alternativa que contribui na degradação de pesticidas e ao mesmo tempo pode ser aplicada para conservação de alimentos é a radiação ionizante.

A irradiação é um processo físico empregado para garantir a segurança, aumentar a vida útil dos alimentos, além de retardar o processo germinativo em produtos vegetais (Farkas, 2006; Farkas e Farkas, 2011; Thomas et al., 2008). As vantagens da aplicação da radiação ionizante incluem a sanitização e

desinfestação dos alimentos e é útil como tratamento fitossanitário (Morehouse, 2002; Hallman, 2011).

O método QuEChERS é baseado no trabalho desenvolvido e publicado por Anastassiades e colaboradores (2003), utilizado na análise de multiresíduos de pesticidas presente nos alimentos e produtos agrícolas. QuEChERS tem sido empregado em análises de diferentes agrotóxicos, medicamentos veterinários e várias matrizes de alimentares, especialmente frutas e vegetais. A metodologia QuEChERS tem muitas variações como a estabelecida pela AOAC (2007), UNE-EN 15662 (2008) e o método original (Anastassiades et al., 2003).

Os pesticidas presentes em alimentos e extraídos pelo método QuEChERS podem ser analisados, identificados e quantificados utilizando diferentes técnicas cromatográficas como a cromatografia gasosa (GC) acoplada com detectores de espectrometria de massa em *tandem*, (MS/MS) (Alder et al., 2006; Payá et al., 2007).

O objetivo deste capítulo foi investigar os efeitos da radiação ionizante sobre a degradação do pesticida profenofós em amostras de ervilhas após serem irradiadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras e Reagentes

As vagens de ervilhas frescas foram adquiridas aleatoriamente no mercado varejista da cidade de Strasbourg, na França e armazenadas sob refrigeração de 4 °C.

O profenofós ($C_{11}H_{15}BrClO_3PS$, 96.9 %), a atrazina ($C_8H_{14}ClN_5$, 98.8 %), a coluna SPE tubo Carbono/ NH_2 com volume de 6 mL, tubo extração de acetato de 12 mL, sulfato de magnésio anidro ($MgSO_4$, ≥ 97 %), kit de sais QuEChERS (6 g de sulfato de magnésio, 15 g de acetato de sódio (CH_3COONa)), e sulfato anidro de magnésio ($MgSO_4$, ≥ 97 %) foram adquiridos na empresa Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

Os solventes acetonitrila, tolueno, acetato de etila com grau para análises de resíduos de pesticidas e etanol absoluto foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

2.2 Métodos

2.2.1 Preparação da Amostra

As soluções padrão de profenofós foram preparadas sob o abrigo da luz, em frascos âmbar e sempre mantidas sob refrigeração (4 °C). A solução mãe foi preparada com 1 mg/mL de profenofós diluído em acetonitrila, partindo desta foi realizado uma nova diluição de 100 ppm de profenofós em etanol absoluto. Assim, 10 μ L da solução de 100 ppm de profenofós em etanol foram adicionados em 10 g de ervilha.

Todas as amostras foram pesadas, acondicionadas em embalagens de poliamida/polietileno, lacradas e identificadas com as respectivas doses de radiação.

2.2.2 Irradiação

As amostras de ervilha foram irradiadas utilizando o acelerador Rhodotroncom (IBA, Louvainla Neuve, Belgique), pela empresa Beta Gamma Service GmbH & Co, localizada em Bruchsal, na Alemanha.

A tensão do feixe de elétrons aplicado foi de 10 MeV com uma corrente de 15 mA e 160 cm de largura de feixe. A irradiação foi realizada em condições padrão de temperatura e pressão 25 °C e 1 atm, respectivamente. As doses absorvidas de radiações aplicadas foram 0 (controle); 4,5; 12,2 e 30,4 kGy.

Para estimar a dose absorvida foi realizado o monitoramento com dosímetros radiocrômicos FWT 60.00 (Far West Technology, Goleta, CA), previamente calibrados com dosímetros de alanina (Aérial, Illkirch, França) (Kuntz et al., 1996). A uniformidade de dose foi de aproximadamente 10 % dentro da amostra e esta foi alcançada pelo uso de uma lâmina de espalhamento de cobre de 100 µm de espessura (Kuntz et al., 1991). As amostras ervilhas irradiadas e o controle foram congelados.

2.2.3 Moagem criogênica da ervilha e protocolo do método QuEChERS

As amostras de ervilha irradiadas e o controle foram submetidas a moagem criogênica.

As amostras foram inoculadas cuidadosamente e uniformemente com 20 µL de uma solução de 100 ppm de atrazina (padrão interno) diluída em etanol (PA).

As vagens de ervilhas (10 g da amostra) foram inseridas em cubeta de policarbonato com volume de 50 mL (FIG.3.1 e FIG. 3.2). A cubeta era composta com duas tampas e no interior um pendulo (impactor) de aço inoxidável para auxiliar a moagem. Os frascos foram montados de acordo com as instruções do fabricante e limpos com detergente e água destilada antes da sua reutilização.

FIGURA 3.1 - Frasco de policarbonato, tampas e pêndulo de aço inoxidável

FIGURA 3.2 - Frasco de policarbonato com vagens de ervilhas

O frasco foi colocado no equipamento moinho criogênico (modelo 6870 Freezer/Mill, Spex Sample Prep, Metuchen, EUA), preenchido com nitrogênio líquido (FIG.3.3).

FIGURA 3.3 - Freezer/Mill

O método de criomoagem compreendeu três ciclos: dois minutos de pré-congelamento, três minutos de moagem e um minuto de congelamento em

nitrogênio líquido. Depois de moídas, as amostras foram recuperadas na forma de pó fino, armazenadas em tubo de polipropileno (50 mL).

2.2.4 Protocolo do método QuEChERS

O método QuEChERS abordado neste estudo foi desenvolvido por Anastassiades e colaboradores (2003) e formalizado pela Norma Europeia EN 15662 (2008) para preparo de amostras para extração de resíduos de pesticidas de frutas e legumes.

O preparo do método QuEChERS envolveu 10 g de amostras de ervilha moída, homogenizada, seguida pela extração do analito com 10 mL de acetonitrila (1 mL de acetonitrila por 1 g de amostra). Foi agitado manualmente por um minuto para o solvente interagir com a amostra. O passo seguinte, foi adicionar o conteúdo do kit de sais de QuEChERS (6 g de MgSO_4 e 1,5 g de CH_3COONa) em tubo de polipropileno contendo a amostra

Os tubos foram fechados e agitados vigorosamente à mão durante um minuto e centrifugados com velocidade de 3200 rotações por minuto (rpm) durante cinco minutos para promover a partição/extração da água a partir da fase orgânica e a sua desidratação. O sobrenadante foi cuidadosamente recolhido e transferido para um tubo com volume de 12 mL contendo 1 g de sulfato anidro de magnésio. A mistura foi agitada manualmente durante um minuto e centrifugada a 3200 rpm por cinco minutos.

O sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio de vidro. Os extratos recuperados foram concentrados até 1 mL à temperatura ambiente, usando um sistema de evaporação de nitrogênio a Turbovap LV (Biotage, Charlotte, NC) e adicionado 250 μL de tolueno.

Extratos de ervilha foram submetidos ao processo de *clean up*, utilizando um tubo SPE com volume total de 6 mL, contituído de 500 mg de partículas esféricas de carbono na parte superior e 500 mg aminopropil esférica (NH_2) na camada inferior, como pode ser observado na FIG. 3.4. Os dois adsorventes SPE foram separados por um *frits*.

FIGURA 3.4 - Coluna SPE - Carbon/NH₂

Fonte – Sigma-Aldrich (2015) (<http://www.sigmaaldrich.com>)

Os cartuchos de SPE foram condicionados com 10 mL da solução de acetonitrila/tolueno (75/25, v/v).

O extrato de ervilha diluído com tolueno foi percolado no cartucho e eluído com 20 mL de uma mistura de acetonitrila/tolueno (75/25, v/v). Após esta etapa foi recolhido toda a solução de percolação e eluição em um tubo de ensaio. Os volumes recuperados foram evaporados até à secura sob uma ligeira corrente de gás nitrogênio à temperatura ambiente utilizando um sistema Turbovap LV e adicionou-se 200 µL de acetato de etila. As amostras foram cuidadosamente transferidas com uma pipeta Pasteur para um frasco de vidro de 2 mL e analisadas em GC-MS/MS.

A FIG. 3.5 ilustra o esquema de todo o protocolo analítico utilizado durante este estudo. Cabe ressaltar que durante as etapas de condicionamento, percolação e eluição, as soluções foram percoladas com força gravitacional.

FIGURA 3.5– Descrição esquemática do QuEChERS e o procedimento de *clean up* para ervilhas irradiadas

As amostras de ervilha foram analisadas em triplicata. As concentrações de profenofós foram expressas em porcentagem. Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP).

2.3 Análise com GC-MS

O profenofós extraído das amostras de ervilhas foi identificado e quantificado com um cromatografo gasoso acoplado com dois espectro de massa com íon trap (MS /MS).

As análises com GC-MS/MS foram realizadas num sistema cromatográfico Varian STAR 3400 acoplado a uma coluna de injeção SPI um injector ligada com um detector de massa sensíveis Varian 2000 SATURN (Varian, França).

O controle instrumental, aquisição e processamento de dados foram realizados pelo software Varian Saturn WS, versão 6.9.1.

As soluções de ervilha foram separadas em uma coluna capilar analítica Varian VF-5ms (60 m; 0,25 mm de diâmetro interno, Varian-França) e com fase estacionária de 5 % de fenil, 95 % de dimetil polissiloxano, espessura de 0,1 mm. O volume de injeção utilizado foi de 1,0 μ L

A temperatura do GC iniciou-se com 80 °C, elevando se a 280 °C durante 1 min à 5°C/min com período de 40 min de análise.

As condições de operação do injetor foram realizadas com volume de injeção de 1 μ L, com temperatura iniciado injetor de 105 °C e foi aumentada para 300 °C à 100 °C/min (mantido por 40 min).

O hélio com pureza de 99,9995 % foi utilizado como fluxo de gás de arraste com vazão de 1 mL/min.

O modo de ionização espectros de massa e o Impacto Eletrônico (EI) foram obtidos a 60 eV e monitorados em uma variação *full-scan* (m/z 40-600). Os dados quantitativos foram realizados utilizando espectrometria de massa (MS/ MS).

2.4 Fator de resposta relativo e validação da metodologia

O RRF é um parâmetro analítico utilizado em procedimentos cromatográficos como uma medida da resposta do detector em relação ao instrumento em comparação com profenofós e a atrazina (padrão interno).

As áreas dos picos cromatográficos de diferentes concentrações de profenofós analisados por GC MS/MS permitiram o cálculo do RRF (Julien-David et al., 2014). As análises foram realizadas em triplicata. A estimativa de RRF foi quantificada como se segue:

$$n_c = \frac{A_c}{A_{is}} n_{is} \left[RRF_c \frac{\tau_{is}}{\tau_c} \right] \quad (2.1)$$

Isolando o RRF_c obtém-se:

$$RRF_c = \frac{n'_c A'_{is}}{n'_{is} A'_c} RRF_{is} \quad (2.2)$$

Na qual:

A_c - área recuperada da solução de profenofós

A_{is} - área recuperada da solução de profenofós e da solução de atrazina

RRF_c - fator de resposta relativa

RRF_{is} - fator de resposta do padrão interno

n_c - número de mols da solução de profenofós

n_{is} - número de mols da solução de atrazina

Métodos de validação são elementos importantes para a precisão das análises cromatográficas e a detectar sensibilidade do método, como exemplo, os limites de detecção e de quantificação (LoQ e LoD).

O LoD foi definido como a menor concentração do analito numa amostra que apresentasse uma razão sinal/ruído (S/N) de 3. O LoQ foi definido como a menor concentração do analito de uma amostra que com a razão sinal/ruído (S/N) de 10.

LoD e LoQ foram obtidos através das injeções sucessivas do composto puro com diferentes concentrações.

A linearidade e a curva de calibração foram calculadas com soluções 0,004 a 0,5 ppm de profenofós em acetato de etila. A quantificação de cada concentração foi obtida com auxílio do padrão interno.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Método QuEChERS

O método QuEChERS é amplamente utilizado para a determinação multirresíduo de pesticidas em matrizes complexas. O procedimento QuEChERS envolve uma extração inicial com acetonitrila utilizado para a limpeza da amostra (AOAC, 2007).

A acetonitrila foi escolhida como solvente de extração, pois pode ser aplicada em uma grande variedade de pesticidas com diferentes polaridades, não ser carcinogênica e possuir baixa volatilidade (Anastassiades et al., 2003).

A adição de absorventes ($\text{CH}_3\text{COONa} + \text{MgSO}_4$) na etapa de partição, purifica a amostra e remove o conteúdo de água do extrato de ervilha. A presença dos sais promoveu o efeito *salting out* e contribuiu para aumentar a recuperação dos analitos mais polares, diminuir a solubilidade desses compostos em fase aquosa e quantidade de água na fase orgânica (Prestes et al., 2009).

A adição de MgSO_4 impulsionou contribuiu para remoção de componentes polares do extrato de ervilha. O MgSO_4 anidro é caracterizado por ser um agente secante muito eficiente. Durante a absorção de água ocorreu a liberação de energia indicando um processo exotérmico. Como resultado ocorreu um aquecimento do tubo durante as etapas de extração/partição. O processo térmico favorece a extração dos pesticidas e a remoção da água (Anastassiades et al., 2003).

A etapa de *clean up* dos extratos de ervilha foi de fundamental importância para efetuar a redução ou eliminação co-extrativos da amostra, incluindo pigmentos e outros interferentes presentes no extrato da matriz antes de realizar as análises cromatográficas. O extrato de ervilha foi percolado em um cartucho SPE normalmente empregado para efetuar o *clean up* e extrair multiresíduos de pesticidas.

De acordo com as especificações do fabricante os cartuchos Carbono/ NH_2 são constituídos por partículas esféricas, resistentes que melhoram as

características do fluxo, possibilitando a percolação dos extratos de ervilha aplicando a força gravitacional. O tubo SPE empregado possuiu uma dupla camada de partículas esféricas de carbono e uma de amino propil esférica (NH_2) – sílica modificada ofereceu ótimas condições de fluxo para uma eficiente limpeza das amostras de ervilha inoculadas com profenofós.

O carbono teve um efeito quelante e caracterizou-se por possuir uma forte afinidade com moléculas planares, contribuiu para remover pigmentos, esteróis, aminopropil (NH_2), ácidos orgânicos, ácidos graxos, pigmentos polares e açúcares presentes na matriz.

3.2 Seleção do Padrão interno

A atrazina foi selecionada como padrão interno para compensar erro aleatório e sistemático, além de quantificar o profenofós presente na amostra. Atrazina foi escolhida por possuir tempo de retenção próximo ao do profenofós, não reagir com o analito proposto e outros componentes da matriz (Zamy et al., 2004).

3.3 Determinação cromatográfica usando GC-MS/MS

A FIG. 3.6 representa o perfil cromatográfico de amostras de ervilhas irradiadas com 4,5 kGy. A atrazina está representada no pico 1, enquanto o pico 2 o profenofós.

FIGURA 3.6 - Cromatograma do extrato de ervilhas irradiadas nas doses absorvidas de 4,5 kGy. Sendo o pico 1 o padrão interno e pico 2 o profenofós

Os dados quantitativos foram obtidos com GC-MS/MS. As condições analíticas e os limites de detecção de ervilhas estão apresentados na TAB 3.1.

TABELA 3.1 - Condições de detecção por GC-MS/MS: tempo de retenção, fatores de resposta relativos (RRF), tempos de retenção (Tr) da atrazina e do profenofós

Pesticida	Tr (min)	RRF	Íons pais	Íons filhos
			Identificação	Quantificação
Atrazina	22,25	1,0	216	200
Profenofós	30,5	0,50±0,05	337, 339	309

A metodologia foi validada com a construção de uma curva de calibração calculada com a plotagem da área do pico dos agrotóxicos versus diferentes concentrações das soluções de profenofós. A linearidade das curvas de calibração, os limites de detecção, o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9958$) estão representados na TAB. 3.2. A sensibilidade do método foi avaliada com valores de LoD e LoQ 0,0163 µg/mL e 0,0489 µg/mL, respectivamente, para o profenofós. Os baixos valores de LoD e LoQ obtidos mostram que o método cromatográfico foi igualmente sensível. O LoQ obtido foi menor que o LMR para

profenofós em ervilhas estabelecido pelo MAPA, comprovando a eficiência e exatidão da metodologia desenvolvida para detecção de profenofós por GC-MS/MS.

TABELA 3.2 - Linearidade e limite de detecção do profenofós em ervilhas

Analito	Análise linear		Limite de detecção (µg/mL)	Limite de Quantificação (µg/mL)
	Equação de regressão	R ²		
Ervilhas com profenofós	y = 2.0749x	0,9958	0,0163	0,048

Curvas de calibração foram obtidas plotando a área do pico em função da concentração de profenofós

A degradação de profenofós por feixe de elétrons está representada na TAB. 3.3. As doses de radiação 4,5; 12,2 e 30,4 kGy influenciaram na degradação do pesticida. Porém, a irradiação não foi suficiente para degradar 100 % do profenofós, ou seja, as vagens de ervilhas irradiadas com 30,4 kGy foi capaz de degradar 57,46 % do agrotóxico. A degradação não foi mais efetiva nas doses de 12,2 e 30,4 kGy devido à interação da energia com as moléculas de água presente nas vagens de ervilha.

TABELA 3.3 - Eficiência de remoção de profenofós por feixe de elétrons

Dose (kGy)	Porcentagem (%)
0	100
4,5	63,73
12,2	60,15
30,4	57,46

Bargańska, Ślebioda e Namieśnik (2013) investigaram 30 pesticidas presentes em 45 amostras de mel em apiários localizados em Pomerania (Polônia). Os níveis de concentração de resíduos de agrotóxicos foram extraídos pelo método de QuEChERS e analisados por Cromatografia Líquida acoplada a uma fonte de ionização por Electrospray tandem Espectrometria de Massas (LC-ESI-MS/MS). Dentre todos os pesticidas encontrados (fenpyroximate, metidationa, espinosade, tiametoxam e triazofós), o profenofós foi o mais abundante nas amostras.

FIGURA 3.7 - Degradação de profenofós após a irradiação por feixe de elétrons analisados por GC-MS/MS em várias doses absorvidas. Barra de indica o erro padrão médio

Lu e colaboradores (2012) investigaram a presença de pesticidas em amostras maçã, espinafre, pepino. As amostras foram inoculadas com uma solução com diferentes agrotóxicos na concentração de 0,01 µg/g a 0,025 µg/g. O método QuEChERS modificado (aplicação do sal CH_3COONa) foi utilizado para extração de pesticidas e os extratos concentrados foram analisados por online-GPC-GC/MS. As matrizes tiveram recuperações médias variadas entre 80 e 118 % para a maioria dos pesticidas testados exceto para profenofós (77 % na maçã) e clorpirifós (68 % em maçã e 75 % em pepino). Os resultados do ensaio de proficiência mostraram que o método QuEChERS foi bem sucedido para a recuperação dos pesticidas.

4. CONCLUSÃO

O método QuEChERS mostrou-se eficaz para extrair o profenofós em vagens de ervilha.

O aumento da dose absorvida de radiação promoveu uma diminuição na concentração de profenofós, mas não de forma linear.

As quantidades do pesticida presente nas amostras irradiadas tiveram valores abaixo que os estabelecidos pelo LMR do MAPA. A detecção de baixas concentrações de profenofós por GC-MS/MS comprovou a sensibilidade, eficiência e a efetividade da metodologia empregada neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGROFIT - Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 15 jan. 2015.
2. ALDER, L.; GREULICH, K.; KEMPE, G.; VIETH, B. Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS? **Mass Spectrom. Rev.**, v. 25, n. 6, p. 838–865, 2006.
3. ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S.J., STAJNBAHER, D., SCHENCK, F.J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce, **J. AOAC Int.**, v. 86, n. 22, p. 412-431, 2003.
4. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Method 2007.01** - Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate, Gas Chromatography Mass Spectrometry and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, First Action, 2007.
5. BARGAŃSKA, Ż.; ŚLEBIODA, M.; NAMIEŚNIK, J. Pesticide residues levels in honey from apiaries located of Northern Poland. **Food Cont.**, v. 31, p.196-201, 2013.
6. BRUZZONITI, M. C.; CHECCHINI, L.; CARLO, R. M.; SERENA ORLANDINI, S.; RIVOIRA, L.; DEL BUBBA, M. QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: a critical review. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 406, p. 4089–4116, 2014.
7. EN15662:2008, Foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean up by dispersive SPE - QuEChERS-method.
29. EU PESTICIDES DATABASE - EUROPEAN COMMISSION. Disponível em: <<http://ec.europa.eu>>. Acesso em: 10 jan. 2015.
8. FARKAS, J. Irradiation for better foods. **Trends Food Sci. Technol.** v. 17, p. 148–152, 2006.
9. FARKAS, J.; FARKAS, C. M. History and future of food irradiation. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 22, p. 121–126, 2011.
10. HALLMAN, G. J. Phytosanitary Applications of Irradiation Comprehensive Reviews. **Food Sci. and Food Safety**, v. 10, n. 2, p. 143-151, 2011.
11. ISMAIL B. S.; NGAN C. K. Dissipation of Chlorothalonil, Chlorpyrifos, and Profenofós in a Malaysian Agricultural Soil: A Comparison Between the Field

- Experiment and Simulation by the PERSIST Model, **J. Environ. Sci. Heal. B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 40, n. 2, p. 341-353, 2005.
12. JULIEN-DAVID, D.; ZHAO, M.; GEOFFROY, P.; MIESCH, M., RAUL, F., AOUDÉ-WERNER, D., ENNAHAR, S., MARCHIONI, E. Analysis of sitosteryloleate esters in phytosterols esters enriched foods by HPLC–ESI–MS². **Steroids**, v. 84, p. 84–91. 2014.
 13. KUNTZ, F.; PABST, J. Y.; DELPECH, J. P.; WAGNER, J. P.; MARCHIONI, E. Alanine-ESR in vivo dosimetry. A feasibility study and possible applications. **Appl. Radiat. Isotopes**, v. 47, p. 1183–1188, 1996.
 14. KUNTZ, F.; MARCHIONI, E.; STRASSER, A. Homogénéisation de la dose déposée dans un produit ionisé aux électrons accélérés. In: International Symposium on High Dose Dosimetry for Radiation Processing, Nov 5-9, 1990, Vienna. Proceedings. IAEA (International Atomic Energy Agency), Report IAEA SM 314/30, p. 479-488, 1991.
 15. LU, D.; QIU, X.; FENG, C.; JIN, Y.; LIN, Y.; XIONG, L.; WEN, Y.; WANG, D.; WANG, G. Simultaneous determination of 45 pesticides in fruit and vegetable using an improved QuEChERS method and on-line gel permeation chromatography–gas chromatography/mass spectrometer, **J. Chromatogr. B**, v. 895, n. 896, p. 17–24, 2012.
 16. MOREHOUSE, K. M. Food irradiation - US regulatory considerations. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 63, p. 281–284, 2002.
 17. NASREDDINE, L.; PARENT-MASSIN, D. Food contamination by metals and pesticides in the European Union. Should we worry? **Toxicol. Lett.**, v. 127, p. 29–41, 2002.
 18. ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO - FAO. **Limites máximos del codex para residuos de plaguicidas**. Disponível em: <<http://www.fao.org/waicent/faostat/Pest-Residue/pest-s.htm>>. Acesso em: 15 abr. 2014.
 19. PAYÁ, P.; ANASTASSIADES, M.; MACK, D.; SIGALOVA, I.; TASDELEN, B.; OLIVA, J.; BARBA, A. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gAs and liquid chromatography and tandem mass spectrometry detection, **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 389, n. 6, p. 1697-1714, 2007.
 20. RAJESH, E.; PILO, B. Single dose neurotoxicity screening studies of insecticide combination (Cypermethrin and Profenofós) in Wistar rats, **Toxicol. Int.**, v. 16, p. 97–102, 2009.

21. SHIA, M.; ZHANGA, Z.; YUA, S.; WANGB, K.; GILBERTB, R. G.; GAOA, Q. Pea starch (*Pisum sativum* L.) with slow digestion property produced using β -amylase and transglucosidase. **Food Chem.**, v. 164, p. 317–323, 2014.
22. SIGMA - ALDRICH – **Super Sphere Carbon/ NH_2 SPE Tube**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/54283u?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 21 jan. 2015.
23. THOMAS, J.; SENTHILKUMAR, R. S.; KUMAR, R.R.; MANDAL, A. K. A.; MURALEEDHARAN, N. Induction of γ irradiation for decontamination and to increase the storage stability of black teas. **Food Chem.**, v. 106, n. 1, p. 180–184, 2008.
24. ZAMY, C. ; MAZELLIER, P.; LEGUBE, B. Phototransformation of selected organophosphorus pesticides in dilute aqueous solutions. **Water Res.**, v. 38, p. 2305–2314, 2004.
25. ZOHARY, D.; HOPF, M. Domestication of Plants in the Old World: the origin and spread of cultivated plants in West Asia. **Oxford University Press, Oxford**, 2000.

CAPÍTULO IV

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR PARA A EXTRAÇÃO SELETIVA DE PROFENOFÓS

Os polímeros de impressão molecular foram sintetizados com a molécula de profenofós e aplicados como adsorventes para extração em fase sólida (SPE). A polimerização foi realizada por via radicalar. Os MIPs foram sintetizados com ácido metacrílico (MAA) ou estireno como monômero funcional, etileno glicol dimetacrilato (EGDMA) ou divinilbenzeno (DVB) como agente de reticulação, 2,2'-azo-bis-iso-butyronitrila (AIBN) como iniciador radicalar e o profenofós como molécula molde. Os solventes empregados nas diferentes sínteses foram: acetonitrila, metanol ou tolueno. Ademais, com propósito de avaliar a seletividade do adsorvente foram preparados paralelamente polímeros não impressos molecularmente (NIP). O objetivo deste capítulo foi sintetizar cinco Polímeros Molecularmente Impressos (MIP I, II, III, IV e V), caracterizar a capacidade de adsorção e de recuperação em SPE do profenofós. O MIP I não apresentou cavidades específicas, MIP II não obteve polimerização e os MIP III, IV e V se caracterizam por possuir poucos sítios ativos e baixo reconhecimento molecular.

1. INTRODUÇÃO

Profenofós é classificado como inseticida e acaricida utilizado em várias culturas agrícolas (AGROFIT, 2015) e desempenham um papel importante na contínua dinamização da produção agrícola (Kolberg et. al., 2011).

Normalmente, os métodos tradicionais de preparo da amostra requerem grandes volumes de solventes orgânicos, além de apresentarem custos elevados e difícil manipulação (Sánchez-Ortega, 2005). Técnicas efetivas que consomem menos tempo e requerem uma menor quantidade de solventes estão sendo desenvolvidas e aplicadas para extração de agrotóxicos em amostras aquosas. Dentre estas técnicas destacam-se a extração em fase sólida (SPE - Solid Phase Extraction) como polímeros de impressão molecular. que foi utilizado neste trabalho.

O processo de impressão molecular é aplicado como uma tecnologia emergente para a produção de materiais poliméricos altamente seletivos e quimicamente resistentes podendo ser reutilizáveis (Turiel e Esteban, 2010).

Os MIPs caracterizam-se por serem materiais rígidos e tridimensionais, sintetizados ao redor de uma molécula molde por meio de ligações não-covalentes. O complexo entre o *template* e os monômeros funcionais é o principal responsável pela formação dos sítios de reconhecimento estruturados. Estes complexos são construídos através de reações *cross link* com auxílio do agente de reticulação. Após a remoção da molécula molde da matriz polimérica com solventes porogênicos, os sítios específicos de reconhecimento são expostos, ou seja, exibe reconhecimento molecular ao analito molde (Barros et al., 2010; Kmellar et al., 2008).

As vantagens do MIP são: síntese rápida, baixo custo, fácil armazenamento sem perder sua atividade, resistência mecânica e sua aplicabilidade. Diferentes pesquisadores utilizaram os MIPs como adsorventes para concentração de analitos em diferentes matrizes, por exemplo, extração de pesticidas de soluções aquosas e em vegetais (Pichon e Chapuis-Hugon, 2008; Jing et al., 2009), atrazina (KoohPaei et al., 2008), benzo(a)pireno (Lai et al.,

2004), carbamazepina (Beltran et al. 2007), nitrofenol (Masque et al. 2000) e sulfoniluréias (Zhu et al., 2002).

Este capítulo apresentou uma proposta inovadora para síntese por polimerização radicalar e caracterização de polímeros impressos, com o profenofós como molécula molde, o estireno ou MAA como monômeros orgânicos, ainda com ABIN ou EGDMA como iniciadores radicalares e como solvente o MeOH, ACN ou tolueno.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes e materiais

As sínteses de MIPs foram realizadas com os seguintes reagentes: ácido metacrílico (MAA, 99 %), etileno glicol dimetacrílico (EGDMA), 2,2'- azo-bis-iso-butironitrila (AIBN), divinilbenzeno (DVB), estireno (99,0 %), ácido acético (para pesticidas) adquiridos na Sigma–Aldrich.

A acetonitrila de grau cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi obtida na VWR Scientific Products (Pensilvânia, Estados Unidos).

A água ultra pura foi fornecida pelo sistema Synergy Milli-Q System (Millipore, Molsheim, França).

Os cartuchos SPE com volume de 4,0 mL e os discos de polietileno sinterizado (*frits*) foram obtidos da Interchim (Montluc, França).

2.2 Sínteses dos Polímeros de Impressão Molecular

As sínteses dos MIPs executadas neste trabalho seguiram metodologia adotada por Lordel (2011) com algumas modificações.

A rota sintética para obter polímeros com suporte impresso de SPE foi baseada na polimerização em bloco por via radicalar, com abordagem não covalente. Os MIPs foram sintetizados com a razão molar do *template* / monômero funcional / agente reticulante de 1/4/20. As quantidades específicas de cada reagente estão elencadas na TAB.4.1.

TABELA 4.1 - Sínteses de polimerização radicalar

Polímero	Profenofós (mmol)	Monômero funcional (mmol)	Agente Reticulante (mmol)	Iniciador Radicalar – AIBN (mg)	Solvente
MIP I	0,25	1 (MAA)	5 (EGDMA)	10	1,4 mL de ACN
MIP II	0,25	1 (MAA)	5 (EGDMA)	10	1,4 mL de tolueno
MIP III	0,25	1 (estireno)	5 (DVB)	10	1,4 mL de MeOH
MIP IV Refrigeração	0,25	1 (estireno)	5 (DVB)	10	1,4 mL de MeOH
MIP V	0,25	1 (estireno)	5 (EGDMA)	10	1,4 mL de MeOH

Todos os reagentes foram homogenizados em tubo de ensaio: a molécula impressa (0,5 mmol), o monômero funcional (2 mmol), agente reticulante (10 mmol), solvente (1,4 mL de ACN ou 1,4 de MeOH ou 1,4 mL de tolueno) e iniciador radicalar (10 mg de AIBN).

Os reagentes foram agitados até obter uma solução límpida. Os frascos foram vedados, imersos em gelo e purgados com gás nitrogênio durante 10 minutos para desaeração dos tubos, remover o oxigênio e impedir a formação de radicais livres que interferem no processo de polimerização. Os tubos fechados foram transferidos para um forno com ventilação constante à 64 °C por 24 horas para iniciar a reação de polimerização por via térmica.

Após esta etapa obteve um polímero como um bloco (monólito). O tubo de ensaio da síntese foi quebrado com auxílio de um martelo e o monólito foi triturado com auxílio de um gral e pistilo, peneirado com granulometria variando de 25 a 36 µm para obter partículas de tamanhos homogêneas e transferidos para pequenos frascos de vidro. As partículas finas, após o peneiramento, foram eliminadas com adição de 10 mL da solução de MeOH/H₂O (80/20, v/v) no frasco de vidro que continha o polímero, agitado para dispersar as partículas do polímero e após 20 minutos de decantação, as partículas maiores decantaram e o sobrenadante foi extraído com auxílio de uma pipeta de Pasteur. O processo de sedimentação foi realizado em triplicata. O adsorvente foi seco dentro de uma capela com fluxo de ar constante à temperatura ambiente.

Concomitantemente, foram sintetizados os Polímeros Não Impressos (NIP) nas mesmas condições que MIP sem adição da molécula de profenofós para

investigar a natureza da estrutura seletiva, proporção de interações não específicas realizadas fora das cavidades dos polímeros e como polímero controle. O esquema de síntese de MIP está representado na FIG. 4.1.

Ainda vale ressaltar que o MIP IV foi sintetizado com as mesmas proporções dos reagentes empregados no MIP III. Na síntese do MIP IV o profenofós, estireno e o metanol foram homogeneizados em um tubo de ensaio, mantidos sob refrigeração durante 16 horas. Após este período, adicionou-se o DVB e AIBN homogenizou a solução, colocou o tubo no banho de gelo e seguiu com o mesmo procedimento de síntese de todos os MIPs. O mesmo processo foi realizado com o NIP, mas sem o *template*.

FIGURA 4.1 - Síntese do MIP

2.3 Preparo da coluna SPE

Os materiais resultantes da etapa anterior (100 mg do MIP e 100 mg do NIP) foram assentados em discos de polietileno sintetizado (*frits*) previamente inseridos em cartuchos de extração vazios de SPE posicionados em sua base, o segundo *frits* foi posicionado no topo da fase polimérica.

Após as extrações, os cartuchos foram armazenados com 2 mL de ACN e vedados. Em seguida foram armazenados sob refrigeração até realização de novo perfil de eluição.

O controle da pressão para percolação das diferentes soluções pelos polímeros foi realizado com auxílio de seringa de polipropileno de 30 mL acoplada na parte superior do cartucho de extração, obtendo uma vazão de eluição de uma gota por segundo.

A caracterização dos MIPs foi realizada pelo perfil de eluição e análises por HPLC/UV

2.4 Dessorção da molécula molde do polímero

Antes de iniciar o protocolo de extração foi realizada a eliminação parcial ou total da molécula impressa dos MIPs com lavagens sucessivas com diferentes solventes hidrofóbicos como: ACN, MeOH e DCM.

A eliminação do *template* do profenofós nos diferentes MIPs foram percolados com os solventes descritos abaixo:

- MIP I – 23 mL de ACN, 10 mL de MeOH, 10 mL de MeOH com 10 % de ácido acético e 32 mL de DCM;
- MIP II – Não se aplicou;
- MIP III - 55 mL de ACN, 10 mL de MeOH com 10 % de ácido acético e 77 mL de DCM;
- MIP IV - 76 mL de ACN;
- MIP V - 10 mL de DCM e 160 mL de ACN.

Alíquotas eluídas provenientes da passagem solventes pelos adsorventes extratores eram recuperadas constantemente e analisadas em HPLC-UV para detectar a presença ou ausência da molécula de profenofós nos MIPs.

2.5 Caracterização do perfil de eluição em SPE

A avaliação analítica dos polímeros impressos consistiu em condicionar a coluna com solvente apolar com volume otimizado durante a execução do

trabalho, percolado com solução aquosa de profenofós (1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós diluído em água deionizada ou em DCM). A etapa de lavagem utilizou diferentes concentrações e volumes de ACN, MeOH e H₂O. A eluição foi precedida por lavagens para eliminar espécies interferentes na matriz com os solventes MeOH ou ACN. Na etapa de lavagem e eluição foi necessário otimizar o volume adequado para remoção máxima do analito para cada MIP analisado. O mesmo protocolo foi realizado na segunda coluna composta pelo Polímero Não Impresso (NIP).

O protocolo de extração de profenofós pelo adsorvente presente no tubo SPE foi realizado com aplicação de vácuo para eluir as diferentes soluções empregadas. As soluções de todas as etapas do perfil de eluição foram recuperadas, injetadas e analisadas no HPLC-UV.

2.5.1 Caracterização MIP I

O perfil de eluição do MIP I foi constituído com o condicionamento de 3 mL de água deionizada, percolado com 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em diclorometano, a solução desta etapa foi recuperada e evaporada com fluxo de nitrogênio a seco, em seguida foi adicionado 1 mL de ACN e analisada no HPLC/UV. A etapa de lavagem de 1 mL de ACN/MeOH (90/10, v/v) foi aplicado para romper as interações polares que podem se desenvolver dentro das cavidades. A última etapa, a eluição com 2 mL de MeOH foi aplicada com o intuito de romper as interações formadas entre o *template* e as cavidades do polímero.

Paralelamente a este procedimento foi aplicado o mesmo perfil de eluição para o NIP I para verificar a seletividade do polímero impresso.

O MIP I não apresentou retenção da molécula de profenofós e sem possibilidades de otimização do perfil de extração foi sintetizado um novo polímero (MIP II).

2.5.2 Caracterização MIP II

Na síntese do MIP II utilizou o tolueno como solvente apolar ao invés da ACN. O emprego do tolueno foi uma tentativa de favorecer a interação entre o

monômero e a molécula molde para formação das cavidades do polímero. Contudo, o MIP II não apresentou polimerização, desta forma, foram sintetizados novos polímeros.

2.5.3 Caracterização MIP III

O procedimento de extração empregado para o MIP III consistiu: condicionamento de 3 mL de H₂O, seguido com a percolação de 1 mL da solução aquosa de 2 µg/mL de profenofós; lavagens de 1 mL de H₂O/ACN (80/20, v/v), 1 mL de H₂O/ACN (70/30, v/v), 1 mL de H₂O/ACN (60/40, v/v); e eluição com 1 mL de ACN. O mesmo procedimento foi empregado para NIP III para verificar a eficiência extração do MIP III.

2.5.4 Caracterização MIP IV

Na síntese do MIP IV foram inseridos em um tubo de ensaio a molécula molde, monômero funcional e o solvente, homogenizados e mantidos sob refrigeração durante 16 h para fortalecer a interação entre o profenofós e o estireno. Posteriormente ao processo térmico, os tubos de ensaio foram acondicionados em banho de gelo e adicionados o DVB e AIBN. De maneira análoga foi sintetizado o NIP IV, sem adição de profenofós.

O MIP IV teve o seguinte protocolo de extração: condicionamento de 2 mL de solução de aquosa com 1 % de ácido acético; percolado com 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H₂O, com três etapas de lavagem com 1 mL de H₂O/ACN (60/40, v/v) em cada fração e eluída com 1 mL de ACN.

A fim de obter uma melhor extração do pesticida, o protocolo de extração foi otimizado com condicionamento com 3 mL de H₂O; percolação de 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H₂O. A lavagem foi realizada em três etapas com diferentes porcentagens de MeOH diluído em H₂O (L1 = 1 mL de MeOH/H₂O (40/60, v/v), L2 = 1 mL de MeOH/H₂O (30/70, v/v), L3 = 1 mL de MeOH/H₂O (20/80, v/v)); finalizando com a 3 mL de MeOH.

2.5.5 Caracterização MIP V

O perfil de eluição para MIP V e NIP V foi constituído com condicionamento de 3 mL água destilada, percolação com 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H₂O; seguido de três lavagens (L1 = 1 mL de MeOH/H₂O (40/60, v/v), L2 = 1 mL de MeOH/ H₂O (30/70, v/v); L3 = 1 mL de MeOH/ H₂O (20/80, v/v)) e a eluição de 1 mL de MeOH.

O perfil de eluição foi otimizado para verificar a presença de poros e cavidades. Foi utilizado o mesmo protocolo descrito anteriormente para o condicionamento e percolação. Contudo a etapa de lavagem foi eliminada e a coluna foi eluída com 3 mL de MeOH.

2.6 Validação do método

A validação da metodologia possibilitou avaliar a eficiência do processo analítico e fornecer confiabilidade nos resultados experimentais. Os parâmetros avaliados no processo de validação foram linearidade, curva de calibração e limites de detecção (LoD) e quantificação (LoQ).

A linearidade foi determinada por de curvas analíticas com diferentes concentrações de profenofós. Entretanto, antes de confeccionar a curva de calibração foram realizados testes com diferentes porcentagens de ACN (100, 50, 40, 20 % de ACN em solução aquosa) que continha 2,0 µg de profenofós por 1 mL do solvente, para verificar a similaridade das área dos picos cromatográficos obtidos e analisar se a variação de diferentes porcentagens de ACN influenciaria na quantificação do pesticida.

A equação linear de regressão ($y = ax + b$) para quantificar o analito foi realizada a partir de uma solução estoque de profenofós a 1 mg/mL em ACN.

A curva de calibração foi construída a partir da diluição de profenofós em solução aquosa (80 % de ACN) com cinco níveis de concentração (0,2; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0 µg/mL). As diluições foram preparadas em triplicatas e o MIP I foi quantificado com uma curva de calibração com concentrações 0,2 até 5,0 µg/mL de profenofós diluído em água.

A precisão do método foi verificada em termos de repetitividade e precisão intermediária, expressas como coeficiente de variação.

Os limites de detecção (LoD) e quantificação (LoQ) foram respectivamente calculados por $(3 \times DP)/\alpha$ e $(10 \times DP)/\alpha$, na qual DP é o desvio padrão da curva e α o coeficiente angular da reta, ou seja, LoD foi estabelecido como valor três vezes a amplitude do ruído da linha de base do cromatograma e LoQ como o valor de dez vezes a amplitude do ruído de base.

2.7 Método cromatográfico

A determinação de profenofós foi realizada por cromatografia líquida constituído de PROSTAR 410 *auto sampler*, dois Prostar (210) do sistema de distribuição de solvente, um Prostar 330 arranjo de Photo-diodos (PDA) - detector UV/vis (Varian, lesUlis, França).

As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna analítica Nucleosil C18 AB (4 x 125 nm) e com tamanho partícula de 5 μm (Macherey-Nagel EUA).

O volume de injeção foi 10 μL e a corrida cromatográfica foi realizada com a fase móvel constituída da mistura de H_2O e ACN (20/80, v/v) com detecção no comprimento de 220 nm. Todas as separações foram conduzidas a temperatura ambiente. Depois de cada injeção, a agulha e o *loop* de injeção foram lavados em triplicata com MeOH grau HPLC.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sínteses dos MIPs foram conduzidas para o desenvolvimento de polímeros com sítios de reconhecimento molecular específico para o profenofós. Houve variação na proporção de reagentes (iniciador radicalar, agente de reticulação e monômero funcional), o volume e tipo de solvente, para desenvolvimento de um adsorvente com condições ótimas de polimerização, seletividade e eficiência.

3.1 Perfil cromatográfico do profenofós

A FIG. 4.2 representa o perfil cromatográfico da solução de percolação de 2 µg/mL de profenofós diluído em água deionizada analisado em HPLC com detecção ultravioleta e comprimento onda de 220 nm.

FIGURA 4.2 – Cromatograma da solução de 2 µg/mL de profenofós diluído em água deionizada

3.2 Eliminação da molécula molde

Antes de iniciar o protocolo de extração foi eliminado o *template* dos polímeros. Para isso foi utilizado solventes hidrofóbicos como MeOH, ACN, DCM,

pois a água pura não permite a eluição do profenofós presente nos MIPs devido as ligações hidrofóbicas e π - π do *template* com o polímero.

3.3 Caracterização do MIP

Os MIPs foram sintetizados com profenofós, com diferentes monômeros polares (MAA ou estireno) e diferentes agentes de reticulação (EGDMA ou DVB).

O MAA e o estireno foram escolhidos devido à possibilidade de favorecer as interações polares (pontes de hidrogênio ou interações eletrostáticas) entre o monômero e o profenofós, além de resultar o desenvolvimento das cavidades de polímeros impressos seletivos. Para obter um MIP eficiente, a molécula impressa deve conter número suficiente de funções químicas com habilidade de desenvolver interações fortes não-covalentes com o monômero funcional (Pereira e Rath, 2009).

O solvente aprótico e moderadamente polar foi empregado para que não houvesse competição com o monômero e favorecer o desenvolvimento das interações entre o *template* e o monômero, visto que, os solventes com constantes dielétricas elevadas podem interferir na ligação de hidrogênio entre o molde estabelecido e o monômero (Yan, 2005).

A seletividade dos polímeros MIPs foi avaliada por meio do fator de impressão obtido pela razão da resposta MIP/NIP. As quantidades conhecidas do analito foram carregadas sob as mesmas condições nos cartuchos com polímero impressos e não-impressos.

3.3.1 Caracterização do MIP I

Os polímeros MIP I e II foram sintetizados com MAA, EGDMA e solvente aprótico (moderadamente polar). As interações entre os reagentes tornaram susceptíveis o desenvolvimento das interações polares com a molécula de profenofós.

Os perfis de eluição obtidos para o MIP I e NIP I mostraram que não houve retenção do profenofós em ambos polímeros e ocorreu a liberação do agrotóxico

na etapa de percolação. Ainda uma pequena porcentagem do profenofós foi recuperada na fração de lavagem (FIG. 4.3). Os valores de recuperação da molécula impressa para MIP I foi de 94,73 % na percolação, na lavagem 1,76 % e na eluição 3,51 %. Para o NIP foi obtido 92,01 % na percolação, na lavagem 2,67 % e 5,32 % na eluição.

Como a recuperação de profenofós foi ligeiramente maior no MIP pode atribuir que o *template* não foi eliminado completamente da matriz polimétrica antes de iniciar o protocolo de extração ou ocorreu a formação de interações polares fracas entre os grupos funcionais do profenofós com o MAA.

Os resultados confirmam a dificuldade de obtenção de cavidades seletivas para o profenofós e que o processo de extração não pode ser otimizado para melhorar a extração seletiva do analito, pois praticamente todo pesticida foi recuperado na etapa de percolação no MIP I.

FIGURA 4.3 - Perfil de eluição do MIP I obtido após C = 3 mL de H₂O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em diclorometano; L = 1 mL de ACN/MeOH (90/10, v/v); E1 e E2 = 1 mL de MeOH

3.3.2 Caracterização do MIP II

O MIP II foi confeccionado empregando MAA, EGDMA, AIBN e o tolueno, entretanto essa síntese não apresentou polimerização, logo não foi obtido um monólito. O MIP II não apresentou respostas coerentes e satisfatórias para dar continuidade aos experimentos com este polímero.

3.3.3 Caracterização do MIP III

Os polímeros MIP III, IV e V foram sintetizados utilizando o estireno como monômero funcional, DVB (MIS III e IV) e EGDMA (MIS V) como agente reticulante na razão molar de 1/4/20, com o MeOH como solvente porogênico e com a molécula de profenofós como molécula impressa.

O estireno foi empregado com propósito de favorecer as ligações hidrofóbicas e do tipo π - π com o ciclo aromático presente na molécula de profenofós, permitindo a formação de cavidades e polímeros impressos seletivos. A presença do DVB como agente reticulante confere ao polímero propriedades hidrofóbicas.

Os valores das porcentagens recuperadas para o MIP III e NIP III em cada fração são similares como pode ser visualizadas na FIG. 4.4 (a, b e c), demonstrando que não houve seletividade do polímero. A caracterização de MIP III mostrou que pode ser possível obter um polímero seletivo com as interações hidrofóbicas, do tipo π - π entre o monômero e a molécula impressa.

Os resultados obtidos não permitiram aplicar o MIP III para a extração seletiva de profenofós devido baixa seletividade e não repetitividade dos resultados.

FIGURA 4.4 (a, b e c) - Perfil de eluição do MIP III obtido após C = 3 mL de H₂O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H₂O; L1 = 1 mL de H₂O/ACN (80/20, v/v), L2 = 1 mL de H₂O/ACN (70/30, v/v); L3 = 1 mL de H₂O/ACN (60/40, v/v); E = 1 mL de ACN.

3.3.4 Caracterização do MIP IV com refrigeração

O *template* e o monômero funcional do MIP IV foram submetidos a refrigeração por 16 h para fortalecer as interações entre o monômero e a molécula impressa e contribuir na formação de cavidades do polímero. A etapa de lavagem do perfil de extração foi realizada com solução aquosa de 40 % de ACN que esta representada na FIG. 4.5 (a, b e c).

FIGURA 4.5 (a, b e c) – Perfil de eluição do MIP IV obtido após C = 2 mL da solução aquosa com 1 % de ácido acético; P = 1 mL da solução de 2 $\mu\text{g/mL}$ de profenofós em H_2O ; L1, L2 e L3 = 1 mL de $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (60/40, v/v); E = 1 mL de ACN

Os perfis de eluição obtidos mostraram que não houve seletividade do profenofós. Com a finalidade de avaliar a influência do solvente sobre a eficiência do MIP, foram otimizados a etapa de lavagem utilizando soluções aquosas com diferentes porcentagens de MeOH.

FIGURA 4.6 (a, b e c) - Perfil de eluição do MIP IV obtido após C = 3 mL de H₂O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H₂O; L1 = 1 mL de MeOH/H₂O (40/60, v/v), L2 = 1 mL de MeOH/H₂O (30/70, v/v); L3 = 1 mL de MeOH/H₂O (20/80, v/v); E = 1 mL de MeOH

Os resultados (FIG. 4.6 (a, b e c)) mostram uma possível presença de cavidades e capacidade de retenção da molécula impressa quando comparado as porcentagens de recuperação do MIP IV com NIP IV. Contudo, os perfis de extração obtidos tanto com a solução de lavagem de ACN quanto de MeOH ilustraram que não houve uniformidade de recuperação de profenofós. O polímero não reteve o pesticida com as mesmas porcentagens de recuperação na etapa de lavagem e eluição, logo não forneceu resultados confiáveis para reprodução na extração de profenofós por SPE.

3.3.5 Caracterização MIP V

O MIP V foi sintetizado com o profenofós e o estireno para favorecer a formação de possíveis interações intermoleculares para a retenção seletiva do analito. O MIP V foi sintetizado utilizando EGDMA responsável pela conformação tridimensional dos polímeros, iniciador radicalar ABIN e como solvente o MeOH.

Primeiramente, foi testado um perfil de eluição com três etapas de lavagem e verificou-se que a porcentagem de recuperação tanto do MIP V quanto do NIP V são semelhantes, demonstrando que a fase polimérica não reteve o pesticida percolado pela coluna SPE devido a baixa seletividade e/ou a ausência e/ou poucas de cavidades disponíveis no MIP V (FIG. 4.7).

FIGURA 4.7 – Perfil de eluição do MIP V obtido após C = 3 mL de H₂O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H₂O; L1 = 1 mL de MeOH/H₂O (40/60, v/v), L2 = 1 mL de MeOH/H₂O (30/70, v/v); L3 = 1 mL de MeOH/H₂O (20/80, v/v); E = 1 mL de MeOH

Com o intuito de otimizar o perfil de extração e verificar a seletividade do polímero foi eliminada a etapa de lavagem. A FIG. 4.8 apresenta os perfis de eluição do MIP V e mostra a não uniformidade dos valores obtidos na etapa de eluição, ou seja, ocorreu a flutuação da porcentagem recuperada nas primeiras etapas de eluição e evidenciou a não seletividade do MIP V quando comparado com o NIP V.

FIGURA 4.8 (a, b e c) – Perfil de eluição do MIS V obtido após C = 3 mL de H₂O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H₂O; E1, E2 e E3 = 1 mL de MeOH

3.4 Análise dos MIPs e seus constituintes

A baixa seletividade dos polímeros pode ser atribuída à fraca interação entre os monômeros funcionais e a molécula de profenofós, formando um complexo monomérico com pouca estabilidade. Os resultados obtidos neste estudo verificaram que os MIPs I e II não apresentaram características para ser utilizados como adsorvente em leito fixo. Enquanto, que os MIPs III a IV desenvolveram micro cavidades com tamanho, forma e estrutura complementar a da molécula de profenofós, sem seletividade suficiente para utilizar os polímeros como adsorvente de leito fixo.

Bakas e colaboradores (2014) sintetizaram o MIP para extração seletiva do pesticida organofosforado, o fentião. O MIP obtido foi aplicado como adsorvente para extrair o fentião de amostras de azeite. Os pesquisadores utilizaram um polímero com base de acrilamida, solvente dimetilformamida, etileno glicol

dimetacrilato como um agente de reticulação e o 1,1-azo-bis (isso-butironitrila) como iniciador radicalar. O MIP sintetizado permitiu a extração de fentião de amostras de azeite com uma taxa de recuperação de cerca de 96 %.

Sanagi e colaboradores (2013) extraíram os analitos alvos, diazinon, quinalfos e clorpirifos, presentes em uvas e maçã verde por meio do MIP. Os polímeros foram desenvolvidos com quinalfos como molde, MAA, ACN, EGDMA e AIBN. As amostras foram preparadas com 150 g de uvas e maçãs verdes trituradas. Nos frasco contendo as frutas adicionou 10 mL de metanol e 10 mL de água e a solução foi mantida em ultrassons durante 15 min. A suspensão resultante foi filtrada e enriquecida com 0,25 mg/L de diazinon, quinalfos e clorpirifós. A amostra foi eficientemente extraída em MIP. As porcentagens de recuperação do MIP para diazinon quinalfos e clorpirifos foram de 97,7 %; 101,0 % e 91,5 %; respectivamente. Para NIP foram recuperados 70,0 %; 66,5 % e 62,7 % para o diazinon, quinalfos e clorpirifos.

Em outro estudo, pesquisadores sintetizaram dois MIPs com o triclorfão e monocrotofos como a molécula molde, além do mais, utilizaram MAA, EGDMA, AIBN e clorofórmio. Os autores utilizaram como SPE uma mistura do MIP de triclorfão e do MIP-monocrotofos na proporção de 20:80 (p/p). Foram utilizadas amostras de colza e couve-flor que foram inoculadas em soluções de dois pesticidas organofosforados. Amostras foram separadamente trituradas, filtradas e percoladas em coluna SPE e a recuperação dos pesticidas foi de 88,5 % para colza a 94,2 % para couve-flor (Wang et al., 2014)..

3.5 Validação da metodologia

A TAB 4.2 representa as áreas cromatográficas analisadas em HPLC/UV de soluções de profenofós com diferentes porcentagens de solventes. Os valores das áreas recuperadas permitiram atribuir que em soluções aquosas com diferentes concentrações de acetonitrila e metanol não influenciaram na quantificação do profenofós.

TABELA 4.2 - Diferentes soluções aquosas (com ACN e MeOH) de profenofós obtidas por HPLC-UV

Solução	Porcentagem	Área
- 100 µL de uma solução com 100 ppm de profenofós em ACN; - 4900 µL de H ₂ O;	H ₂ O/ACN (98/2)	78605
- 100 µL de uma solução com 100 ppm de profenofós em ACN; - 4900 µL de ACN;	ACN (100)	189803
- 100 µL de uma solução com 100 ppm de profenofós em ACN; - 2400 µL de ACN; - 2500 µL de H ₂ O;	H ₂ O /ACN (50/50)	197749
- 100 µL de uma solução com 100 ppm de profenofós em ACN; - 1900 µL de MeOH; - 3000 µL de H ₂ O;	H ₂ O /MeOH (60/40)	208166
- 100 µL de uma solução com 100 ppm de profenofós em ACN; - 900 µL de ACN; - 4000 µL de H ₂ O.	H ₂ O /ACN (80/20)	205944

Os parâmetros analíticos utilizados para validação dos métodos de separação foram a linearidade através da curva de calibração e do coeficiente de determinação (R^2) (TAB. 4.3). A equação da reta apresentou coeficiente de determinação (R^2) de 0,994 para solução aquosa e 0,999 solução aquosa com 80 % de ACN. O limite de quantificação determinado foi de 0,15 µg/mL para o LoD e 13,5 µg/mL para o LoQ de profenofós em ACN.

TABELA 4.3 - Parâmetros analíticos de cromatografia gasosa para profenofós

Analito	Análise linear		Limite de detecção (µg/mL)	Limite de Quantificação (µg/mL)
	Curva de Calibração	R ²		
Profenofós diluído em solução aquosa	$y = 38681 x - 11882$	0,994	0,15	13,5
Profenofós em solução aquosa com 80 % de ACN	$y = 10067 x + 3211$	0,999	0,15	13,5

As curvas de calibração foram obtidas plotando as áreas de pico (y) vs concentração (x)

4. CONCLUSÃO

As sínteses poliméricas realizadas com propósito de explorar diferentes tipos de interações não covalentes e formar cavidades seletivas para a molécula de profenofós não foram bem desenvolvidas.

Os MIPs I e II não foram seletivos para o profenofós. Os MIPs III, IV e V mostraram uma retenção do agrotóxico muito fraca e apresentaram baixo grau de seletividade, não sendo apropriado para extração em fase sólida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGROFIT - **Sistemas de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 15 jan. 2015.
2. BAKAS, I.; BEN OUJJI, N.; ISTAMBOULIÉ, G.; PILETSKY, S.; PILETSKA, E.; AIT-ADDI, E.; AIT-ICHOU, I.; NOGUER, T.; ROUILLON, R. 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. 313-318, 2014.
3. BARROS, L. A.; MARTINS, I.; RATH, S. A selective molecularly imprinted polymer-solid phase extraction for the determination of fenitrothion in tomatoes. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 397, p. 1355-1361, 2010.
4. BELTRAN, A.; CARO, E.; MARCE, R. M.; CORMACK, P. A. G.; SHERRINGTON, D. C.; BORRULL, F. Synthesis and application of a carbamazepine-imprinted polymer for solid-phase extraction from urine and waste water. **Anal. Chim. Acta**, v. 597, p. 6-11, 2007.
5. JING, T.; GAO, X. D.; WANG, P.; WANG, Y.; LIN, Y. F.; HU, X. Z.; HAO, Q. L.; ZHOU, Y. Z.; MEI, S. R. Determination of trace tetracycline antibiotics in foodstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with selective molecular-imprinted solid-phase extraction. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 393, n. 8, p. 2009-2018, 2009.
6. KMELLAR, B.; FODOR, P.; PAREJA, L.; FERRER, C.; MARTINESZ-UROZ, M. A.; VALVERDE, A.; FERNANDEZ-ALBA, A. R. Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1215, n. 1-2, p. 37-50, 2008.
7. KOLBERG D. I.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Development of a fast multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (wheat grains, flour and bran) using QuEChERS based method and GC-MS. **Food Chem.**, v. 125, n. 4, p. 1436-1442, 2011.
8. KOOHPAEI, A. R.; SHAHTAHERI, S. J.; GANJALI, M. R., RAHIMI-FROUSHANI, A.; GOLBABAEI, F. Molecular imprinted solid phase extraction for trace level determination of atrazine in environmental samples. **J. Environ. Health Sci. Eng.**, v. 5, p. 283-296, 2008.
9. LAI, J.; NIESSNER, R.; KNOPP, D. Benzo[a]pyrene imprinted polymers: synthesis, characterization and SPE application in water and coffee samples. **Anal. Chim. Acta**, v. 522, p. 137-144, 2004.

10. LORDEL, S. **Synthèse et caractérisation de polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction sélective de résidus d'explosifs pour le développement de dispositifs de terrain**. 2011. Tese (Doutorado), Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, Paris –França.
11. MASQUE, N.; MARCE, R. M.; BORRULL, F.; Cormack, P.A.G.; Sherrington, D.C. Synthesis and Evaluation of a Molecularly Imprinted Polymer for Selective On-line Solid-Phase Extraction of 4-Nitrophenol from Environmental Water. **J. Anal. Chem.**, v. 72, p. 4122-4126, 2000.
12. PEREIRA, L. A; RATH, S. Molecularly imprinted solid-phase extraction for the determination of fenitrothion in tomatoes. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 393, p. 1063–1072, 2009.
13. PICHON V, CHAPUIS-HUGON F. Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants--a review. **Anal. Chim. Acta**, v. 622, n. 1-2, 2008.
14. SANAGI, M.M.; SALLEH, S.; IBRAHIM, W. A. W.; NAIM, A. A.; HERMAWAN, D.; MISKAM, M.; HUSSAIN, I.; ABOUL-ENEIN, H. Molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for the analysis of organophosphorus pesticides in fruit samples. **J. Food Compos. Anal.**, v. 32, n. 2, p. 155–161, 2013.
15. SÁNCHEZ-ORTEGA, A.; SAMPEDRO, M. C.; UNCETA N.; GOICOLEA, M. A.; BARRIO, R. J. Solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography using on-line diode-array and electrochemical detection for the determination of fenitrothion and its main metabolites in environmental water samples. **J. Chromatogr. A**, v. 1094, n. 1-2, p. 70-76, 2005.
16. TURIEL, E.; ESTEBAN, A. M. Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review. **Anal. Chim. Acta**, v. 668, p. 87–99, 2010.
17. YAN, M. *Molecularly Imprinted Materials Science and Technology*, Marcel Dekker, Marcel Dekker, New York, 2005.
18. ZHU, Q. Z; DEGELMANN, P.; NIESSNER, R.; KNOPP, D. Selective Trace Analysis of Sulfonylurea Herbicides in Water and Soil Samples Based on Solid-Phase Extraction Using a Molecularly Imprinted Polymer. **Environ. Sci. Technol.**, v. 36, p. 5411-5420, 2002.
19. WANG, X. L.; TANG, Q. H.; WANG, Q. Q.; QIAO, X. G.; XU, Z. X. Study of a molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of trace trichlorfon and monocrotophos residues in vegetables. **J. Sci. Food Agric.**, v. 94, n. 7, p. 1409-1415, 2014.

CAPÍTULO V

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE SÍLICA IMPRESSA MOLECULARMENTE PARA A EXTRAÇÃO SELETIVA DE PROFENOFÓS

A elevada demanda e a necessidade de métodos analíticos que favoreçam testes rápidos, sensíveis, eficientes e seletivos têm contribuído para síntese materiais dotados de sítios ativos de reconhecimento molecular de grande relevância em diferentes áreas do conhecimento. O uso de polímeros de impressão molecular a base de sílica tem se destacado no campo da química analítica, principalmente em procedimentos de extração em fase sólida (SPE). Os MIS deste capítulo foram sintetizados pela tecnologia sol-gel, na qual os monômeros formaram um complexo com a molécula modelo e, após a polimerização, os grupos funcionais foram fixados em posições específicas na estrutura polimérica. Cinco adsorventes foram confeccionados com diferentes razões moleculares dos reagentes. Os polímeros foram sintetizados com a molécula alvo (profenofós), monômero funcional (3-aminopropiltriethoxisilano (APTES) e/ou feniltrimetoxisilano (PTMS)), agente reticulante (tetraetoxisilano (TeOS)), solvente (água) e catalisador básico (hidróxido de sódio (NH_4OH)). Foram preparados os NIS nas mesmas condições do MIS, sem a presença do pesticida. Neste contexto, este capítulo teve como objetivos: sintetizar polímeros impressos seletivos a base de sílica, extração seletiva do profenofós utilizando MIS como fase sólida e a identificação e quantificação por meio de um cromatográfico líquido de alta eficiência detecção ultravioleta (HPLC-UV). Os MIS desenvolvidos se mostraram uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de sistemas com reconhecimento molecular de profenofós dotados de sítios seletivos.

1. INTRODUÇÃO

Antes de abordar a metodologia e caracterização dos MIS, cabe salientar, que os pesticidas desempenham um importante papel na agricultura moderna e são amplamente utilizados em diversas culturas para controlar ou destruir insetos, fungos e pragas, além de contribuir no rendimento da produção agrícola (U.S. EPA, 2014), com destaque o profenofós.

O profenofós é classificado com um inseticida foliar não sistêmico utilizado na agricultura (Reddy e Rao, 2008; Tadeo, 2008). Considerado um pesticida modernamente perigoso pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Abass et al., 2007). Neste sentido, o desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais seletivos, como o MIS, é de grande relevância para o isolamento e purificação de compostos presentes em amostras alimentares, como os pesticidas.

O processo de impressão molecular é uma técnica aplicada para construção de cavidades de reconhecimento seletivo em uma matriz polimérica (Peng et al., 2010) e tem sido utilizada como metodologia promissora para a preparação e reconhecimento de receptores artificiais feitos sob medida que podem ligar seletivamente uma molécula alvo ou substâncias análogas (Luoa et al., 2015). Este método permite sintetizar um polímero inorgânico por meio de reações químicas simples e a temperaturas entre 20 e 150 °C. A síntese é realizada a partir de silano (Si (OR)_4) (Corriu et al., 1996).

Os polímeros de Sílica Impressa Molecularmente podem ser obtidos em meio aquoso pelo método sol-gel e fixam os monômeros funcionais ao redor de um analito alvo de acordo com os grupos ligantes e estereoquímica das moléculas. Em seguida, ocorre uma polimerização com ação de um agente reticulante. A remoção do molde do polímero matriz gera os sítios ativos que são compatíveis com a molécula impressa (Lordel et al. 2010 e 2011; Jiang et al. 2007).

O MIS tem sido considerado uma alternativa prática para produzir materiais adsorventes com propriedades de reconhecimento molecular devido à sua facilidade de utilização, alta seletividade (em termos de tamanho, forma e funcionalidade) e de baixo custo em comparação com outros processos biológicos (Lee e Kim, 2009; Jung et al. 2010).

O objetivo deste capítulo foi desenvolver polímeros de Sílica Impressa Molecularmente preparados através do processo sol-gel, avaliar o adsorvente específico para a SPE de profenofós e os analisar por HPLC-UV. Similarmente ao MIS, a Sílica Não Impressa Molecularmente (NIS) foi sintetizada, porém com ausência da molécula molde.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes e solventes

O profenofós, feniltrimetoxisilano (PTMS), 2,2'- azo-bis-iso-butironitrila (AIBN), hidróxido de amônia (NH_4OH), tetraetoxisilano (TeOS – 99 %) foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) com exceção 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES – 97 %) proveniente da Interchim (Montluçon, França).

A água ultra pura foi fornecida pelo sistema Synergy Milli-Q System (Millipore, Molsheim, França).

O metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) foram de grau cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Os discos de polietileno sinterizado (*frits*) e os cartuchos SPE com volume 4,0 mL foram obtidos da Interchim (Montluc, França).

2.2 Preparo da Sílica Impressa Molecularmente

A metodologia empregada para a de síntese do MIS foi a polimerização por sol-gel e a rota sintética foi baseada na transição do sistema sol com dispersão de partículas coloidais estáveis em fluído, para um sistema gel com estruturas rígidas de partículas coloidais ou cadeias poliméricas.

A síntese foi iniciada inserindo 93,4 mg de profenofós em frasco cilíndrico transparente de 30 mL e misturados com monômero funcional (PTMS e/ou APTES), em seguida foi adicionado o agente reticulante (1675 μL de TeOS) e agitados magneticamente. Adicionou-se 2850 μL de H_2O ultra pura (MilliQ) e a mistura foi homogenizada. Imediatamente após a agitação foi inserido 566 μL de NH_4OH (catalisador) e homogenizado vigorosamente no aparelho *vortex* para aumentar a cinética da reação de condensação. A solução foi agitada até a obtenção de um líquido ligeiramente viscoso e branco.

As quantidades dos reagentes e solventes utilizados para o preparo dos diferentes polímeros de Sílica Impressa Molecularmente com profenofós estão descritos na TAB. 5.1.

Tabela 5.1 Sínteses de polimerização via sol-gel

Polímero	Profenofós (mmol)	Monômero Funcional - APTES (mmol)	Monômero Funcional - PTMS (mmol)	Agente Reticulante - TeOS (μL)	Solvente - H₂O (μL)	Catalisador - NH₄OH (μL)
MIS I (1/4/30)	0,25	-	1,0	1675	2850	566
MIS II (1/4/4/30)	0,25	1,0	1,0	1675	2850	566
MIS III (1/2/2/30)	0,25	0,5	0,5	1675	2850	566
MIS IV (1/1/3/30)	0,25	0,25	0,75	1675	2850	566
MIS V (1/3/1/30)	0,25	0,75	0,25	1675	2850	566

A próxima etapa consistiu em aquecer o frasco em câmara à temperatura de 40 °C, com ligeira agitação por 24 horas com o objetivo de otimizar as reações de condensação até gelificação e a formação de um monólito branco opaco obtido pela polimerização térmica.

O polímero foi resfriado a temperatura ambiente por duas horas dentro de uma capela com fluxo de ar constante e transferidos para uma estufa a 120 °C por 18 horas.

Com auxílio bastão de vidro, os materiais resultantes foram triturados, e tamisados em peneiras para análise granulométrica com diâmetro da partícula entre 25 a 36 μm.

As partículas finas, menores que 25 μm ainda presentes após o peneiramento foram desprezadas e extraídas com o processo sedimentação. O material foi recuperado após o peneiramento e transferido para um tubo de vidro com volume de 30 mL e foi adicionado 10 mL de H₂O/MeOH (20/80, v/v), agitada e deixada decantar por 20 min. O sobrenadante foi eliminado com auxílio de uma pipeta de Pasteur. Esta operação foi realizada em triplicata e em seguida a evaporação do solvente presente no polímero.

Paralelamente, foram preparados polímeros controles, sílica não impressa, sem adição do profenofós. O NIS permite avaliar a seletividade dos polímeros, analisar os sítios não específicos criados durante sua síntese.

A FIG. 5.1 ilustra o esquema de produção do MIS englobando o processo de sedimentação e condicionamento no polímero nos cartuchos de extração.

FIGURA 5.1 – Esquema da produção do MIS e do NIS

2.3 Preparo da coluna MIS

Os cartuchos de extração foram dispostos contendo 100 mg do material impresso de fase estacionária (MIS) e outro com a mesma quantidade com material não impresso (NIS).

Os materiais (MIS e NIS) foram assentados em discos de polietileno sintetizado (*frits*) previamente inseridos em cartuchos de extração vazios, o primeiro posicionado em sua base, o segundo *frits* foi posicionado no topo da fase polimérica.

2.4 Extração do profenofós do MIS antes do perfil de eluição

Antes de caracterizar os adsorventes sintetizados foi preciso proceder a eliminação da molécula impressa. Contudo, no processo de sedimentação com a solução aquosa de 80 % de MeOH promoveu a remoção da molécula impressa presente em todos os MIS sintetizados.

A ausência da molécula impressa foi verificado após percolado 3 mL de ACN pela coluna de extração, recolhendo 1 mL do eluente e analisado por HPLC-UV.

2.5 Procedimento geral de extração para MIS

Após o empacotamento de 100 mg do MIS e do NIS em diferentes cartuchos foi realizado as etapas de condicionamento, carregamento da amostra, lavagem e eluição.

Com auxilio de uma seringa 35 mL as amostras foram percoladas pela coluna SPE com vazão de uma gota por segundo.

Após a extração todas as etapas foram coletadas em diferentes *vails* de volume de 2 mL e analisadas em um HPLC/UV.

Os diferentes cartuchos de MIS e NIS foram condicionados com água purificada ou mistura de solventes (ACN, MeOH e H₂O). O volume e a

concentração dos solventes foram otimizados ao longo do processo de extração, com objetivo de obter um perfil com melhor seletividade do polímero.

O protocolo de extração foi realizado em todos os polímeros com solução de percolação (1 mL de solução contendo 2 µg/mL de profenofós em H₂O).

Com o mesmo propósito do capítulo anterior foram avaliadas as forças das interações entre a molécula de impressão e monômero e empregados procedimentos de extração com diferentes soluções de lavagem.

As soluções de lavagem de 40, 60, 70, 80 % de MeOH e 20, 30 e 40 % de ACN foram percolado para eluir o profenofós e promover desagregação progressiva das interações hidrofóbicas e tipo π - π . Assim, a solução de 40 % de ACN em solução aquosa foi a mais sensível para a extração seletiva do profenofós no MIS I e II, na etapa de lavagem e 20 % para MIS III, IV e V. Também foi testado 25 % de ACN em solução aquosa na etapa de lavagem para o MIS IV.

A etapa de eluição foi empregado solventes ACN ou MeOH com grau HPLC.

2.5.1 Protocolo de extração para MIS I

O protocolo de extração para MIS I foi realizado com condicionamento de 5 mL de água, solução de percolação (1 mL de água com 2 µg/mL de profenofós), volume de lavagem de 250 µL de H₂O/ACN (60/40, v/v) fracionados em três partes. Na etapa de eluição foi estabelecido 1 ou 2 mL de ACN.

2.5.2 Protocolo de extração para MIS II

O suporte de impressão com sílica permitiu pela primeira vez neste trabalho a extração seletiva de profenofós com repetibilidade dos dados. A partir disso, foram desenvolvidos três sínteses do polímero 1/4/4/30 (MIS II.A, MIS II.B, MIS II.C) com os mesmos reagentes, diferentes manipuladores e realizados testes de extração com os adsorventes. Ainda, para testar a repetibilidade e confirmação dos dados obtidos foram realizados testes de extração para o MIS II.A em dias diferentes.

Transferiu-se 100 mg dos polímeros para novo cartucho (MIS II.A – Cartucho II) e realizou a extração do profenofós.

A metodologia empregada para caracterizar o MIS II (A, B e C) foi realizado com condicionamento de 10 mL de água, percolação de 1 mL de solução de 2 µg/mL de profenofós em H₂O, volume de lavagem de 250 mL de H₂O/ACN (80/20, v/v) e na eluição com 4 mL de ACN. Destarte, o processo de extração foi otimizado, modificando a etapa de condicionamento e lavagem para permitir a extração com um elevado grau de seletividade.

O perfil de eluição do MIS II foi otimizado com condicionamento de 5 mL de ACN, 5 mL de MeOH e 5 mL de H₂O, solução de percolação foi de 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H₂O, na etapa de lavagem com 450 mL da solução aquosa 40 % de MeOH e a eluição com 3 mL de ACN.

2.5.3 Protocolo de extração para MIS III, IV e V

O perfil de eluição para o MIS III (1/1/3/30), MIS IV (1/1/3/30) e o MIS V (1/3/1/30) foi estabelecido com condicionamento de 5 mL de água, a etapa de percolação contou com 1 mL solução de 2 µg/mL de profenofós em H₂O, 3 mL de H₂O/ACN (80/20, v/v) na lavagem e na eluição com 4 mL de ACN fracionado em 4 partes de 1 mL.

Além do mais, foram realizadas duas otimizações no procedimento de extração para o MIS IV. A primeira alteração foi na solução de lavagem com a concentração de 25 % de ACN em água e a segunda a mesma porcentagem de ACN com volume de 4 mL (fracionada em três partes de 1 mL e duas de 500 µL).

2.6 Método cromatográfico

O sistema de cromatografia líquida desenvolvido no equipamento de HPLC PROSTAR 410 *auto sampler*, dois Prostar 210 do sistema de distribuição de solvente, um Prostar 330 arranjo de Photo-diodos (PDA) - detector UV/vis (Varian, lesUlis, França).

As separações cromatográficas foram realizadas em coluna analítica Nucleosil C18 AB (4 x 125 nm) (Macherey-Nagel EUA) e com tamanho partícula de 5 µm.

O volume de injeção foi 10 µL e a corrida cromatográfica foi realizada com a fase móvel de H₂O/ACN (20/80, v/v) e com detecção no comprimento de onda de 220 nm. Todas as separações foram realizadas em temperatura ambiente. Depois de cada injeção, a agulha e o *loop* de injeção foram lavados em triplicata com metanol grau HPLC.

2.7 Validação da metodologia analítica

A linearidade foi estimada por meio da construção de curvas calibração com diferentes concentrações (0,2; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 µg/mL) de profenofós diluído em solução aquosa com 20 % de ACN. Paralelamente outra curva com as mesmas concentrações de profenofós foi desenvolvida, porém com 40 % de MeOH em água. Além disso, foram realizados testes com concentração de profenofós conhecida em solução de 100, 50, 40, 20 % de ACN para verificar a similaridade dos picos cromatográficos, similarmente como foi realizado no Capítulo IV. Além disso, foram determinados o Limite de Detecção (LoD) e Limite de Quantificação (LoQ).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização da solução de percolação

O cromatograma de 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós diluído em H₂O foi injetado no HPLC/UV, utilizando como fase móvel a solução aquosa com 80 % de ACN esta ilustrado no Capítulo IV, na seção 3. Resultados e Discussão.

3.1.1 Caracterização do MIS I

O MIS I foi sintetizado com o propósito de permitir as interações não covalente, hidrofóbicas e do tipo π - π entre o monômero funcional e o profenofós para a formação de cavidades específicas.

O primeiro polímero sintetizado com sílica impressa apresentou capacidade de reter as moléculas de profenofós, de acordo com o perfil de eluição mostrado na FiG. 5.2. O polímero impresso obteve uma baixa seletividade, pois o profenofós foi eluído majoritariamente do NIS durante as etapas de lavagem com misturas aquosas orgânicas. A porcentagem de recuperação do profenofós na etapa de eluição foi de 22,69 % para o MIS e 15,15 % para o NIS.

Figura 5.2 - Perfil de eluição do MIS I obtido após C = 5 mL de H₂O; P = 1 mL de H₂O com 2 µg/mL de profenofós; L1 e L2 = 1 mL de H₂O/ACN (60/40, v/v) e L3 = 500 µL de H₂O/ACN (60/40, v/v); E1 e E2 = 1 mL de ACN

As FIG. 5.3, 5.4 e 5.5 apresentaram os valores da etapa de eluição para MIS de 27 %; 37,27 %; 25,17 %, enquanto sobre o NIS foram recuperados valores de 17,90 %; 18,80 % e 9,87 %, respectivamente. Os valores indicam uma ligeira formação de cavidades do polímero impresso e sua seletividade.

Figura 5.3 - Perfil de eluição do MIS I obtido após C = 5 mL de H₂O; P = 1 mL de H₂O com 2 µg/mL de profenofós; L1 e L2= 1 mL de H₂O/ACN (60/40, v/v) e L3 = 500 µL de H₂O/ACN (60/40, v/v); E = 1 mL de ACN.

Figura 5.4 - Perfil de eluição do MIS I obtido após C = 5 mL de H₂O; P = 1 mL de H₂O com 2 µg/mL de profenofós; L1 e L2= 1 mL de H₂O/ACN (60/40, v/v) e L3 = 500 µL de H₂O/ACN (60/40, v/v); E1 e E2 = 1 mL de ACN

FIGURA 5.5 – Perfil de eluição do MIS I obtido após C = 5 mL de H₂O; P = 1 mL de H₂O com 2 µg/mL de profenofós; L1 e L2= 1 mL de H₂O/ACN (60/40, v/v) e L3 = 500 µL de H₂O/ACN (60/40, v/v); E1 e E2 = 1 mL de ACN

Os dados sugerem que não foi possível obter a repetitividade dos resultados, o que não garante a reprodutibilidade do polímero impresso (FIG. 5.3, 5.4 e 5.5) e ser utilizado como SPE. Este fato pode ser atribuído a não uniformidade das taxas de recuperação, devido à etapa de condicionamento, lavagem inadequada ou falhas com a regeneração do polímero.

3.1.2 Caracterização do MIS II

A fim de obter um melhor desempenho e seletividade do polímero com sílica foram desenvolvidos novos polímeros por sol-gel (MIS II, III, IV e V) com a mistura de dois monômeros funcionais (PTMS e APTES). Esses polímeros foram desenvolvidos com diferentes razões molares para favorecer as interações polares e apolares, a molhabilidade do polímero que aumenta a força das ligações hidrofóbicas e a formação de cavidades no polímero impresso.

O MIS II (1/4/4/30) foi o primeiro polímero desenvolvido que confirmou o desenvolvimento de um polímero impresso seletivo com valores de recuperação de extração similares, com grande quantidade da molécula de profenofós retidas no MIS II.A (cartucho I) durante o processo de lavagem e liberados na eluição e no NIS II.A o processo foi inverso, demonstrando a retentividade do pesticida no MIS.

A FIG.5.6 ilustra os resultados obtidos do perfil de extração de profenofós para o MIS II.A presente no cartucho I.

FIGURA 5.6 - Perfil de eluição do MIS II.A (catucho I) obtido após após C = 10 mL de H₂O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H₂O, L1 e L2= 1 mL de H₂O/ACN (60/40, v/v) e L3 = 500 µL de H₂O/ACN (60/40, v/v); E1, E2, E3 e E4 = 1 mL de ACN

A seletividade do MIS II.A pode ser notada na FIG. 5.6. As porcentagens de recuperação na etapa de eluição foram de 97,53 % e 31,48 % para o MIS e o NIS, respectivamente. O polímero MIS II.A (cartucho I) apresentou resultados significativos com baixo desvio padrão, o que indicou boa repetibilidade de cada fração do perfil de eluição.

O mesmo polímero (MIS II.A) foi inserido em um novo cartucho (cartucho II) e submetido ao mesmo perfil de eluição testado anteriormente. Contudo, o resultado de adsorção entre os dois cartuchos foi ligeiramente diferente, o que pode ser atribuído a regeneração polimérica, erros operacionais e a não uniformidade dos poros dos polímeros. A recuperação na etapa de lavagem foi de 35,92 % para MIS II.A (cartucho II), e no NIS II.A (cartucho II) 75,51 % (FIG. 5.7). Não houve recuperação na etapa de percolação. As porcentagens de recuperação indicam a presença de sítios ativos e caracterizam como polímero seletivo.

FIGURA 5.7 - Perfil de eluição do MIS II.A (cartucho II) obtido após C = 10 mL de H₂O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H₂O; L1 e L2 = 1 mL de H₂O/ACN (80/20, v/v) e L3 = 500 µL de H₂O/ACN (80/20, v/v); E1, E2, E3 e E4 = 1 mL de ACN

Com o objetivo de confirmar a seletividade do polímero e a presença de sítios ativos (MIS II.A) foram sintetizados dois novos polímeros (MIS II.B e MIS II.C) sob as mesmas condições do primeiro. Os novos polímeros foram caracterizados com o mesmo protocolo de extração aplicado anteriormente no MIS II.A (FIG.5.8 e 5.9).

FIGURA 5.8 - Perfil de eluição do MIS II.B obtido após C = 10 mL de H₂O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H₂O; L1, L2 e L3 = 1 mL de H₂O/ACN (80/20, v/v) e L3 = 500 µL de H₂O/ACN (80/20, v/v); E1, E2, E3 e E4 = 1 mL de ACN

Os dois perfis obtidos confirmaram a seletividade dos polímeros impressos. As taxas de recuperação da solução de lavagem foram de 16,05 % para MIS II.B e de 57,62,73 %. para NIS II.B. Na eluição foram recuperados 83,19 % e 46,11 % para o MIS II.B e NIS II.B, respectivamente.

FIGURA 5.9 - Perfil de eluição do MIS II.C obtido após C = 10 mL de H₂O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H₂O; L1 e L2 = 1 mL de H₂O/ACN (80/20, v/v) e L3 = 500 µL de H₂O/ACN (80/20, v/v); E1, E2, E3 e E4 = 1 mL de ACN

O MIS II.C apresentou recuperação de profenofós de 29,16 %, enquanto o NIS II.C obteve recuperação de 61,21 % para a solução de lavagem. Os resultados mostraram que o adsorvente sintetizado com base de sílica permitiu a extração seletiva da molécula de profenofós.

Para melhor extração e seletividade do polímero foi otimizado o procedimento de extração, modificando as etapas de condicionamento, lavagem e eluição.

A primeira etapa de otimização do procedimento de extração consistiu na mudança do volume e dos solventes empregados na etapa de condicionamento para favorecer a maior fixação do pesticida. A etapa de percolação permaneceu com as mesmas características, entretanto a lavagem foi substituída com 40 % de MeOH em solução aquosa e a eluição foi mantida com solvente puro. A otimização permitiu extrair com maior seletividade as soluções de profenofós percolados no MIS.

O novo protocolo de extração otimizado foi realizado para os polímeros MIS II.A, MIS II.B e MIS II.C.

FIGURA 5.10 – Perfil de eluição do MIS II.A obtido após C = 5 mL de ACN; 5 mL de MeOH e 5 mL de H₂O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H₂O; L1, L2, L3 e L4 = 1 mL de H₂O/MeOH (60/40, v/v), L5 = 0,5 mL de H₂O/MeOH (60/40, v/v); E1, E2 e E3 = 1 mL de ACN

Os valores dos rendimentos de extração na solução de lavagem de profenofós foram de 26,95 % e 84,59 % para MIS I.A e para NIS I.A, respectivamente (FIG. 5.10). Também foram recuperados os valores da solução de eluição para o MIS I.A, no qual apresentou o rendimento de 73,05 %, diferentemente do NIS I.A com valor de 15,40 % de profenofós.

FIGURA 5.11 - Perfil de eluição do MIS II.B obtido após C = 5 mL de ACN; 5 mL de MeOH e 5 mL de H₂O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H₂O; L1, L2, L3 e L4 = 1 mL de H₂O/MeOH (60/40, v/v), L5 = 0,5 mL de H₂O/MeOH (60/40, v/v); E1, E2 e E3 = 1 mL de ACN

Na FIG. 5.11 estão registrados as porcentagens de profenofós para a etapa de lavagem com valores de 28,77 % para MIS II.B e 83,64 % NIS II.B. Houve uma retenção absoluta na etapa de percolação. A recuperação do pesticida na fração de eluição foi 71,23 % e 16,36 % para MIS II.B e NIS II.B, respectivamente.

FIGURA 5.12 - Perfil de eluição do MIS III.C obtido após C = 5 mL de ACN; 5 mL de MeOH e 5 mL de H₂O, P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H₂O; L1, L2, L3 e L4 = 1 mL de H₂O/MeOH (60/40, v/v), L5 = 0,5 mL de H₂O/MeOH (60/40, v/v); E1, E2 e E3 = 1 mL de ACN

A seletividade e a presença de sítios ativos foi confirmada com o protocolo de eluição otimizado para MIS II.C. A FIG. 5.12 que representa os resultados obtidos com a recuperação de 29,49 % e 87,81 % do profenofós para MIS III.C e para NIS III.C, respectivamente. Para a eluição foram recuperados 70,51 % para o MIS III.C e 12,19 % para o NIS III.C.

3.1.3 Caracterização do MIS III

O polímero MIS III com razão molar de 1/2/2/30 foi sintetizado para verificar se com a metade dos valores molares dos dois monômeros funcionais aumentaria o número de cavidades e seletividade dos polímeros impressos.

Na FIG. 5.13 estão expressos as porcentagens de recuperações de profenofós na etapa de lavagem iguais a 13,73 % para MIS III.C e 73,29 % para NIS III.C. A etapa de eluição apresentou valores de 86,27 % e 26,71 % para o MIS III e para o NIS III, respectivamente.

FIGURA 5.13 - Perfil de eluição do MIS III obtido após C = 5 mL de H₂O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H₂O; L1, L2 e L3 = 1 mL de H₂O/ACN (80/20, v/v); E1, E2, E3 e E4 = 1 mL de ACN

3.1.4 Caracterização do MIS IV

Os rendimentos da extração de profenofós na solução de lavagem para o MIS IV (1/1/3/30) e o NIS IV foram de 0 %, 34,86 %, respectivamente. Além do mais, para solução de eluição o MIS IV teve rendimento de 100 %, diferente do NIS que apresentou valor de 65,14 % (FIG. 5.14). Os baixos valores dos desvios padrão confirmam a eficiência do procedimento de extração na mesma coluna.

FIGURA 5.14 - Perfil de eluição do MIS IV obtido após C = 5 mL de H₂O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H₂O; L1, L2 e L3 = 1 mL de H₂O/ACN (80/20, v/v); E1, E2, E3 e E4 = 1 mL de ACN

A seletividade do MIS IV para profenofós se apresentou melhor com a otimização da etapa lavagem com solução aquosa com 75 % de ACN. Os perfis de eluição obtidos para as novas soluções testadas foram registrados nas FIG. 5.15 e 5.16.

O perfil de eluição mostra que o pesticida ficou retido majoritariamente na etapa de lavagem no MIS e 60,94 % foi recuperado no NIS. O profenofós percolado no MIS foi obtido sua totalidade na etapa de eluição e 39,06 % para NIS.

FIGURAS 5.15 - Perfil de eluição do MIS IV obtido após C = 5 mL de H₂O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H₂O; L1, L2 e L3 = 1 mL de H₂O/ACN (75/25, v/v); E1, E2, E3 e E4 = 1 mL de ACN

O perfil de extração do MIS IV foi otimizado e na etapa de lavagem foi adicionado 2 mL da solução aquosa com 75 % de ACN. Os resultados mostraram que o profenofós ficou fixado no adsorvente com molécula impressa e apresentou rendimento na etapa de lavagem de 7,51 % para MIS IV e o NIS IV, com rendimento de extração de 91,63 % de profenofós. Os valores de recuperação foram de 92,49 % de profenofós para MIS IV, contra 8,37 % do NIS IV na etapa de eluição (FIG. 5.16).

FIGURA 5.16 - Perfil de eluição do MIS IV obtido após C = 5 mL de H₂O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H₂O; L1, L2 e L3 = 1 mL de H₂O/ACN (75/25, v/v), L4 e L5 = 500 µL de H₂O/ACN (75/25, v/v); E1, E2, E3 e E4 = 1 mL de ACN

3.1.5 Caracterização do MIS V

Os rendimentos de eluição para extração de profenofós obtidos no MIS V (1/3/1/30) apresentaram valores de 13,73 % para MIS V e 73,29 % NIS V. Houve uma retenção absoluta na etapa de percolação e o rendimento de extração de profenofós na etapa de eluição foi de 86,27 % e 26,71 % para MIS V e NIS V, respectivamente. Os valores de retenção para MIS V na etapa de lavagem, apesar de haver seletividade, os valores não foram expressivos quando comparados os valores de NIS V (FIG. 5.17). Para contornar a limitação de retenção do MIS V deve-se otimizar o processo de extração utilizando diferentes porcentagens de misturas de solventes polares na etapa de lavagem e eluição.

FIGURA 5.17 - Perfil de eluição do MIS V obtido após C = 5 mL de H₂O; P = 1 mL da solução de 2 µg/mL de profenofós em H₂O; L1, L2 e L3 = 1 mL de H₂O/ACN (80/20, v/v); E1, E2, E3 e E4 = 1 mL de ACN

3.2 Análise dos MIS

Os MIS são adsorventes aplicados em diversas matrizes químicas e biológicas. Como pode ser verificado no trabalho de Silva e colaboradores (2010) que desenvolveram polímeros de sílica molecularmente impressos utilizando 300 mg de 3-aminopropiltrimetoxissilano, 250 mg de TeOS, 2 mL de solução de atrazina e 200 µL de NH₄OH. O MIS foi preparado através do processo sol-gel. O polímero foi avaliado como adsorvente específico para SPE de triazinas. O adsorvente provou ser altamente seletivo para a molécula modelo (atrazina), bem como para outras moléculas análogas.

Lopez-Nogueroles e colaboradores (2013) desenvolveram MIS para determinação da família dos compostos nitro musk e o rastrear em rios, mares e estações de tratamento de água. A extração foi executada com SPE e a concentração dos analitos alvos analisados em cromatógrafo gasoso acoplado com espectro de massa. O procedimento de extração otimizado permitiu a recuperação de 61 % e 87 % utilizando o MIS. Enquanto, o NIS adsorveu 8 % e 26 %, o que evidenciou a alta seletividade do MIS para o nitro musks.

Lordel et al. (2011) sintetizaram MIS para a extração de amostras de explosivos nitro aromáticos de pós-explosão. O potencial destes adsorventes foi empregado para etapa de *clean up* de amostras pós-explosão como: óleo de

motor, de sangue post-mortem, fragmentos calcinados, etc. Assim, dois polímeros foram sintetizados pela metodologia sol-gel e utilizaram como molécula alvo o 2,4-dinitrotolueno (DNT-2,4), monômero o PTMS, agente reticulante o trietoxisilano como agente reticulante. Os polímeros foram confeccionados com as seguintes razões molares: 1/4/20 e 1/4/30. Os compostos nitro aromáticos foram extraídos seletivamente com recuperações superiores de 79 %, demonstrando a eficiência e seletividade dos polímeros sintetizados.

3.3 Parâmetros analíticos da validação da metodologia

As curvas de calibração, o coeficiente de determinação, os LoD e LoQ estão com seus valores estimados estão apresentados na TAB. 5.2.

TABELA 5.2 - Parâmetros analíticos de HPLC-UV para profenofós

Analito	Análise linear		Limite de detecção (µg/mL)	Limite de Quantificação (µg/mL)
	Curva de Calibração	R ²		
Solução aquosa de Profenofós em ACN	$y = 10994x - 1846$	0,999	0,84	2,77
Solução aquosa de Profenofós em MeOH	$y = 97926x - 4713$	0,999	0,65	2,31

As curvas de calibração foram obtidas plotando as áreas de pico (y) vs concentração (x)

4. CONCLUSÃO

O MIS I apresentou retentividade para o profenofós, mas não teve repetitividade nas porcentagens de recuperação do agrotóxico.

O MIS II.A, MIS II.B e MIS II.C apresentaram cavidades específicas para extração seletiva do profenofós. As porcentagens de recuperação do agrotóxico de cada polímeros tiveram uma ligera semelhança.

O MIS III e IV apresentaram seletividade para o profenofós com presença de sítios ativos na matriz polímerica impressa.

O MIS V não apresentou seletividade para o profenofós. Com base nas porcentagens de recuperação de profenofós nos MIS II, III e IV, que utilizaram os mesmos monômeros funcionais, mas diferentes razões molares que o MIS V, era esperado que esse polímero tivesse cavidades específicas para poder extrair o agrotóxico utilizado neste estudo. Assim, a seletividade do MIS V poderia ser demonstrada otimizando o protocolo de extração.

Em suma, os MIS II, III e IV mostraram grande eficiência da estabilidade, reconhecimento molecular e seletividade na extração de profenofós.

5. TRABALHOS FUTUROS

Em trabalhos futuros sugerimos a caracterização do MIS para verificar a seletividade potencial para outros pesticidas organofosforados ou compostos de estruturais análogas ao *template*. Fazer medidas de área superficial específica, volume específico e diâmetro médio dos poros presentes nos polímeros impressos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABASS, K.; REPONEN, P.; JALONEN, J.; PELKONEN, O. In vitro metabolism and interaction of profenofós by human, mouse and rat liver preparations. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 8, n. 3, p. 238-247, 2007.
2. CORRIU, R. P.; LECLERCQ, D. Recent Developments of Molecular Chemistry for Sol–Gel Processes. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 35, p. 1420, 1996.
3. JIANG, X.; TIAN, W.; ZHAO, C.; ZHANG, H.; LIU, M. A novel sol–gel material prepared by a surface imprinting technique for the selective solid-phase extraction of bisphenol A. **Talanta**, v. 72, n. 1, p. 119–125, 2007.
4. JUNG, B. M.; KIM, M. S.; KIM, W. J.; CHANG J. Y. Molecularly imprinted mesoporous silica particles showing a rapid kinetic binding, **Chem. Commun.**, v. 46 2010, 46, p. 3699-3701, 2010.
5. LEE, H. Y.; KIM, B. S. Grafting of molecularly imprinted polymers on iniferter-modified carbon nanotube. **Biosens. Bioelectron.**, v. 25, n. 3, p. 587-591, 2009.
6. LOPEZ-NOGUEROLES, M.; LORDEL-MADELEINE, S.; CHISVERT, A.; SALVADOR, A.; PICHON, V. Development of a selective solid phase extraction method for nitro musk compounds in environmental waters using a molecularly imprinted sorbent. **Talanta**, v. 110, p. 128-34, 2013.
7. LORDEL, S. **Synthèse et caractérisation de polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction sélective de résidus d'explosifs pour le développement de dispositifs de terrain**. 2011. Tese (Doutorado), Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, Paris –França.
8. LORDEL, S.; CHAPUIS-HUGON, F. ; EUDES, V.; PICHON, V. Development of imprinted materials for the selective extraction of nitroaromatic explosives, **J. Chromatogr. A**, v. 1217, n. 43, p. 6674-6680, 2010.
9. LORDEL, S.; CHAPUIS-HUGON, F. ; EUDES, V. ; PICHON, V. Selective extraction of nitroaromatic explosives by using molecularly imprinted silica sorbents. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 399, n. 1, p. 449-458, 2011.
10. LUOA, G.; LI, Y.; WANG, A.; LIN, Q.; ZHANG, G.; WANG, C. Dummy molecularly imprinted mesoporous silicates for selective adsorption of 2-naphthol. **Open Chem.**, v.13, p. 756–762, 2015.
11. PENG, Y.; XIE, Y.; LUO, J.; NIE, L.; CHEN, Y.; CHEN, L.; DU, S.; ZHANG, Z. Molecularly imprinted polymer layer-coated silica nanoparticles toward dispersive solid-phase extraction of trace sulfonylurea herbicides from soil and crop samples. **Anal. Chim. Acta**, v. 2, n. 674, p. 190-200, 2010.

12. REDDY, N. C.; RAO, J. V. Biological response of earthworm, *Eisenia foetida* (savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofós. ***Ecotox. Environ. Safe***, v. 71, n. 2, p. 574-582, 2008.
13. SILVA, R. G. C., VIGNA, R. M.; BOTTOLI, C. B.; AUGUSTO, F. Molecularly imprinted silica as a selective SPE sorbent for triazine herbicides, ***J. Sep. Sci.***, v. 33, n. 9, p. 1319-1324, 2010.
14. TADEO, J. L. ***Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples***, CRC Press, Boca Raton, 2008.
15. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – U.S. EPA. ***About pesticide***, 2014. Disponível em: <www.epa.gov/pesticides>. Acesso em: 12 de fev. 2015.