

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – Unifal-MG

**ANDRÉ COUTINHO VIEIRA**

**EXTRAÇÃO DE FUNGICIDAS TRIAZÓLICOS DE AMOSTRAS DE ÁGUA DA  
REPRESA DE FURNAS POR DISCO IMPREGNADO COM NANOTUBOS DE  
CARBONO SEGUIDO DE ANÁLISE POR GC-MS**

Alfenas/MG

2015

ANDRÉ COUTINHO VIEIRA

**EXTRAÇÃO DE FUNGICIDAS TRIAZÓLICOS DE AMOSTRAS DE ÁGUA DA  
REPRESA DE FURNAS POR DISCO IMPREGNADO COM NANOTUBOS DE  
CARBONO SEGUIDO DE ANÁLISE POR GC-MS**

Exame de defesa apresentado à banca examinadora  
como parte dos requisitos para a obtenção do título  
de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela  
Universidade Federal de Alfenas.  
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Costa de  
Figueiredo.

Alfenas/MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Vieira, André Coutinho.

Extração de fungicidas triazólicos de amostras de água da represa de Furnas por disco impregnado com nanotubos de carbono seguido de análise por GC-MS / André Coutinho Vieira – Alfenas - MG, 2015.

68 f.

Orientador: Eduardo Costa de Figueiredo.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade Federal de Alfenas, 2015.  
Bibliografia.

1. Nanotubos de Carbono. 2. Extração em Fase Sólida. 3.  
Toxicologia. I. Figueiredo, Eduardo Costa de. II. Título.

CDD-615.9

ANDRÉ COUTINHO VIEIRA

**EXTRAÇÃO DE FUNGICIDAS TRIAZÓLICOS DE AMOSTRAS DE ÁGUA DA  
REPRESA DE FURNAS POR DISCO IMPREGNADO COM NANOTUBOS DE  
CARBONO SEGUIDO DE ANÁLISE POR GC-MS**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Defesa de Mestrado apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Análises Toxicológicas.

Aprovada em:

Profº: *Eduardo Costa de Figueiredo*

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: *Eduardo Costa de Figueiredo*

Profº: *Marcio Pozzobon*

Instituição: UFA

Assinatura: *Marcio Pozzobon Pedron*

Profº: *Saul Martins*

Instituição: UNIFAL-MG

*Sakaki Sauer*

Assinatura:

*Saul Martins*

Dedico a Deus, minha amada esposa, meus amados pais e meu irmão, familiares e amigos: pelas bênçãos, apoio e incentivos que me levaram conquista deste desafio.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por todas as bênçãos e por iluminar meu caminho para que mais uma etapa fosse concluída.

Aos meus pais e meu irmão por estarem sempre ao meu lado, dando apoio, conselhos e carinho e me incentivando a buscar meus sonhos.

A minha esposa, que sempre esteve ao meu lado, pela dedicação em me ajudar, pelas palavras nos momentos difíceis e alegria e amor em todos os momentos à sua companhia.

Ao meu orientador, Prof Dr. Eduardo, por toda a paciência e dedicação em me ajudar, por compartilhar seus conhecimentos e estimular sempre a atingir o melhor desempenho.

A minha amiga Patrícia, sempre a disposição para nos ajudar no que for preciso.

Aos amigos e companheiros de trabalho do LATF.

As professoras Isarita e Vanessa.

A Unifal e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

A FAPEMIG e CAPES pelo apoio financeiro.

Meu muito obrigado!

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.

(Paulo Beleki)

## RESUMO

Os praguicidas são uma importante ferramenta na agricultura devido ao seu potencial em prevenir e controlar o crescimento de organismos prejudiciais à lavoura, resultando em um maior rendimento e melhoria da qualidade das plantações. Os fungicidas triazólicos representam uma das classes de praguicida mais empregada na agricultura de frutas, vegetais e grãos, devido ao seu excelente poder protetor, erradicante e curativo contra um amplo espectro de doenças agrícolas. Entretanto, a habilidade desses compostos de alterar a biossíntese de hormônios esteroidais pode resultar em complicações endócrinas para mamíferos, além de alterações nos níveis de colesterol e triglicerídeos e ainda em hepatotoxicidade, fazendo-se necessário o desenvolvimento de técnicas analíticas de preparo de amostras apropriadas para a extração e pré-concentração desses praguicidas nos recursos hídricos e em alimentos. Dentre as técnicas de análise de amostras ambientais, podemos destacar a extração em fase sólida em disco, que permite o emprego de alto volume de amostra e alto poder de pré-concentração dos analitos. Ainda sobre o preparo de amostras, destaca-se o surgimento dos nanotubos de carbono (CNT), um material recentemente empregado como fase extratora com alta capacidade sortiva, elevada área superficial e elevado volume interno, estabilidade e resistência mecânica, química e térmica. Desse modo, este trabalho propõe, pela primeira, vez o emprego de membrana de extração impregnada com CNT para a finalidade de extração de toxicantes orgânicos em amostras ambientais. A metodologia desenvolvida foi validada, seguindo protocolos internacionais de validação e foram obtidos limites de quantificação inferiores aos preconizados por legislações específicas – LIQ entre 0,1 e 0,5 ng.L<sup>-1</sup>, em uma faixa analítica entre 50 e 100 a 10.000 ng.L<sup>-1</sup>, com R<sup>2</sup> superior a 0,99.

Palavras-chave: Nanotubos de Carbono. Extração em Fase Sólida. Toxicologia.



## ABSTRACT

The praguicides are an important tool in agriculture due its potential to prevent and control the growth of harmful organisms to crops, resulting in higher yields and improved quality of crops. The triazol fungicides represent one of pesticide classes mostly employed in agriculture of fruits, vegetables and grains, due to their excellent protective, eradicating and curative power against a broad spectrum of agricultural diseases. However, their ability to change steroid hormone biosynthesis may result in endocrine complications for mammals, as well as changes in cholesterol and triglyceride levels and hepatotoxicity, making necessary the development of analytical techniques for the extraction and pre-concentration of these pesticides on water resources and food. Among the analysis of environmental samples techniques highlight the disk solid phase extraction which allows the use of high sample volume and high pre-concentration power. Still on sample preparation carbon nanotubes (CNT) has been often used as solid extraction phase due to its high sorption capacity, high surface area, high internal volume and mechanical, chemical and thermal strength. Thus, this project proposed for the first time the use of extraction membrane impregnated with CNT for the extraction of organic toxicants in environmental samples. The developed methodology was validated following international validation protocols and quantification limits lower than the recommended by specific legislation were obtained – the limits of quantification were between 0,1 and 0,5 ng.L<sup>-1</sup> – and the analytical range were between 50 and 100 to 10.000 ng.L<sup>-1</sup>, with linear coefficient correlation higher than 0,99.

Keywords: Nanotubes, Carbon. Solid Phase Extraction. Toxicology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Compostos triazólicos mais comumente usados na agricultura e seus metabólitos (1, 2, 4 – triazol, triazolamina e ácido triazoliacético). ....	17
Figura 2 - Estruturas tridimensionais dos nanotubos de carbono compostos por múltiplas camadas (MWCNT).....	27
Figura 3 - Diferentes regiões onde é possível ocorrer a interação do analito com os CNT. ....	28
Figura 4 - Cromatograma obtido após a injeção de uma solução padrão em metanol. ....	38
Figura 5 - Extrações de amostra de fungicidas triazólicos por SPE com CNT como fase estacionária. ....	40
Figura 6 - Preparo de buckypaper por filtração da mistura CNT e solução dispersante previamente tratada com agitação e ultrassom. ....	41
Figura 7 - Preparo de buckypaper por filtração positiva. ....	42
Figura 8 - Foto do disco obtido com as condições de síntese, na metodologia. ....	43
Figura 9 - Fotos de discos submetidos ao processo de impregnação ....	45
Figura 10 - Esquema ilustrativo do processo de extração em disco com disco impregnado com CNT. ....	46
Figura 11 - Estudo do pH da amostra. ....	47
Figura 12 - : Avaliação da capacidade de eluição dos solventes orgânicos. ....	49
Figura 13 - Avaliação da quantidade de discos usados em série no processo de extração. ....	50
Figura 14 - Avaliação do volume de amostra necessário para se trabalhar no equilíbrio. ....	51
Figura 15 - Avaliação do volume de solvente acetato de etila:acetona (1:1, v/v) usado na eluição. ....	52
Figura 16 - Comparação das modificações estruturais sobre a capacidade de extração dos CNT. ....	55
Figura 17 - Cromatograma obtido da análise de uma amostra fortificada na concentração do limite inferior de quantificação. ....	58
Figura 18 - Cromatograma obtido da análise de uma amostra fortificada na concentração do controle de qualidade alto. ....	60
Figura 19 - Cromatograma obtido da análise de uma amostra coletada da represa de Furnas adicionada do padrão interno. ....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo das características dos analitos e dos parâmetros qualitativos obtidos. ...	37
Tabela 2 - Parâmetros obtidos para a curva de calibração calculada através de polinômio para os três analitos em estudo. ....	57
Tabela 3 - Resultados dos testes de exatidão e precisão para o triadimenol. ....	59
Tabela 4 - Resultados dos testes de exatidão e precisão para o tebuconazol. ....	59
Tabela 5 - Resultados dos testes de exatidão e precisão para o epoxiconazol. ....	60

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

- ABRASCO** – Associação Brasileira de Saúde Coletiva
- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CNT** – do inglês *Carbon Nanotubes*, que significa Nanotubos de carbono
- Cooxupé** – Cooperativa dos Produtores de Café do Sul de Minas Gerais
- CQ** – Amostra Controle de Qualidade
- DL<sub>50</sub>** – Dose Letal 50
- EC<sub>50</sub>** – Do inglês *Half Maximal Effective Concentration*, que significa Concentração Efetiva 50, ou concentração capaz de provocar determinado efeito em 50% da população exposta
- ELL** – Do inglês *Liquid-Liquid Extraction*, que significa Extração Líquido-Líquido
- EPA** – Do inglês *Environmental Protection Agency*, que significa Agência de Proteção Ambiental
- FDA** – Do inglês *Food and Drug Administration*, órgão regulatório semelhante a ANVISA no Brasil
- GC-MS** – Do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*, que significa Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas
- IDA** – Ingestão Diária Aceitável
- IUPAC** – Do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*, que significa União Internacional de Química Pura e Aplicada
- LIQ** – Limite Inferior de Quantificação
- LMR** – Limites Máximos de Resíduos
- LMT** – Limite Máximo Tolerável
- MAPA** – Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MEPS** – do inglês *Microextraction By Packed Sorbent*, que significa Microextração com Sorbente Empacotado

- MIP** – do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*, que significa Polímeros de Impressão Molecular
- MMA** – Ministério do Meio Ambiente
- MS** – Ministério da Saúde
- MWCNT** – do inglês *Multi-Walled Carbon Nanotubes*, Nanotubos de Carbono formados por uma várias lâmina
- PARA** – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos nos Alimentos
- PI** – Padrão Interno
- QuEChERS** – técnica de extração em fase sólida dispersiva; do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*, o que significa Rápida, Fácil, Barata, Efetiva, Robusto e Seguro
- SPE** – do inglês *Solid Phase Extraction*, que significa Extração Em Fase Sólida
- SPME** – do inglês *Solid Phase Microextraction*, que significa Microextração em Fase Sólida
- SWCNT** – do inglês *Single-Walled Carbon Nanotubes*, Nanotubos de Carbono formados por uma única lâmina
- USTTF** – do inglês *United States Triazole Task Force*

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
2.1	O USO DE PRAGUICIDAS NA AGRICULTURA .....	15
2.2	FUNGICIDAS TRIAZÓLICOS.....	16
2.2.1	Triadimenol.....	19
2.2.2	Tebuconazol .....	20
2.2.3	Metconazol.....	21
2.2.4	Epoxiconazol.....	21
2.3	REGULAMENTAÇÃO E LIMITES DE EXPOSIÇÃO AOS PRAGUICIDAS .....	22
2.4	EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM DISCO.....	24
2.5	NANOTUBOS DE CARBONO .....	26
2.6	CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS .....	30
3	<b>JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	31
3.1	JUSTIFICATIVA.....	31
3.2	OBJETIVOS.....	31
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	32
4.1	INSTRUMENTAÇÃO.....	32
4.2	MATERIAIS, REAGENTES E SOLUÇÕES.....	32
4.3	FORTIFICAÇÃO DA AMOSTRA .....	33
4.4	IMPREGNAÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO EM MEMBRANA DE CELULOSE.....	34
4.5	PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO.....	34
4.6	MÉTODO CROMATOGRÁFICO .....	35
4.7	VALIDAÇÃO .....	35
4.8	COLETA DAS AMOSTRAS .....	36
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	37
5.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO .....	37
5.2	CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL .....	38
5.3	DISCO IMPREGNADO POR NANOTUBOS DE CARBONO .....	40

5.4	ESTUDO DO pH DA AMOSTRA .....	46
5.5	ESTUDO DO SOLVENTE DE ELUIÇÃO .....	48
5.6	ESTUDO DA QUANTIDADE DE DISCOS .....	49
5.7	ESTUDO DO VOLUME DE AMOSTRA .....	50
5.8	ESTUDO DO VOLUME DE SOLVENTE DE ELUIÇÃO .....	52
5.9	ESTUDO DA NATUREZA E VOLUME DO SOLVENTE DE RESSUPENSÃO..	53
5.10	MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DOS NANOTUBOS DE CARBONO .....	53
5.11	VALIDAÇÃO .....	55
5.11.1	Seletividade .....	56
5.11.2	Linearidade.....	57
5.11.3	Limite de quantificação.....	58
5.11.4	Exatidão e precisão .....	59
6	<b>ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS</b> .....	61
7	<b>CONCLUSÕES</b> .....	62
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	63

## 1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que os praguicidas possuem um grande potencial em prevenir e controlar o crescimento de organismos prejudiciais à lavoura, sendo, por isso, uma importante ferramenta na agricultura. Os fungicidas triazólicos são praguicidas amplamente empregados e suas características como habilidade de alterar a biossíntese de hormônios esteroidais resultando em complicações endócrinas para mamíferos, capacidade de alterar os níveis de colesterol e triglicerídeos, hepatotoxicidade e dificuldade de degradação ambiental, fazem com que haja grande interesse na determinação destes compostos em amostras ambientais e de alimentos. O fato de serem encontrados em níveis residuais e em amostras complexas resulta na necessidade de um eficiente preparo das amostras e de quantificação por instrumentos analíticos avançados. As cromatografias líquida e gasosa e uso de analisadores de espectrometria de massas apresentam vantagens como alta seletividade e baixos limites de detecção, o que permite a análise de amostras complexas contendo os analitos de interesse em concentrações residuais. Nesse sentido, algumas metodologias de preparo de amostras se destacam, como a extração líquido-líquido, QuEChERS, extração em fase sólida e extração em fase sólida em disco. Esta última possibilita uma alta capacidade de concentrar os analitos, trabalhando-se com elevados volumes de amostra, empregando diferentes sorbentes, desde as tradicionais fases estacionárias, como C8 e C18, até polímeros de impressão molecular e, mais recentemente, o uso de nanotubos de carbono (CNT). Esse material tem sido utilizado como fase estacionária no preparo e limpeza de amostras complexas e apresenta características físico-químicas interessantes – como elevada área superficial, elevado volume interno, estabilidade e resistência mecânica, química e térmica e possibilidade de estabelecer interações pi-pi com diversas moléculas, o que permite a pré-concentração e separação de analitos tanto polares como apolares. Desse modo, esse trabalho propõe a montagem de um aparato de extração que permita a fusão da extração em disco com CNT, obtendo-se uma ferramenta poderosa, rápida, barata e prática para a concentração de fungicidas triazólicos em amostras de água da represa de Furnas.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O USO DE PRAGUICIDAS NA AGRICULTURA

Os praguicidas são uma importante ferramenta na agricultura devido ao seu potencial em prevenir e controlar o crescimento de organismos prejudiciais à lavoura, resultando em um maior rendimento e melhoria da qualidade das plantações. Estima-se que aproximadamente um terço da produção agrícola seria perdida se agentes químicos não fossem empregados no controle das pragas. Além disso, os praguicidas são empregados em setores não agrícolas como na preservação de madeira, desinfecção e uso doméstico. (TADEO, 2008; PINTO et al, 2010).

Segundo relatório, produzido em 2012 pela Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO), enquanto o mercado mundial de produção de praguicidas cresceu 93%, o brasileiro cresceu 190%, assumindo em 2008 o posto de maior mercado de praguicidas do mundo. (Carneiro et al, 2012)

O relatório informa ainda que em 2011 foram plantados aproximadamente 71 milhões de hectares de lavoura, o que corresponde a cerca de 853 milhões de litros de praguicidas (produtos formulados) pulverizados sobre estas lavouras - dos quais 14% correspondem aos fungicidas. Esse consumo de praguicidas implica em uma média de uso de 12 litros por hectare e exposição média ambiental/ocupacional/alimentar de 4,5 litros de praguicidas por habitante. (Carneiro et al, 2012)

A maior fonte de contaminação ambiental por praguicidas se deve ao uso indiscriminado destes agentes, o que leva ao debate sobre risco *versus* benefício e a necessidade de pesquisas para avaliar este impacto. (MENEZES FILHO; SANTOS, PEREIRA, 2010)

Após a aplicação no meio ambiente, os praguicidas tendem a degradar ou a se dispersar no meio ambiente por lixiviação ou dispersão. Quando presentes no solo sofrem processo de degradação por ação de microrganismos, degradação química, absorção ou ligação a compostos orgânicos ou metálicos do solo, volatilização, absorção pelas raízes das plantas ou ainda diluição por efeito da ação de água da chuva e de irrigação. Logo, a taxa de degradação aumenta com a temperatura ambiente e a porcentagem de água do solo. (MENEZES FILHO; SANTOS, PEREIRA, 2010; WERF, 1996)

A preocupação com a presença destes compostos em fontes de água iniciou na década de 1960 quando resíduos de inseticidas organoclorados encontrados em amostras de água foram associados à intoxicação de organismos aquáticos por praguicidas. Essa preocupação é maior em determinados países porque, em muitos deles, as águas subterrâneas são a principal fonte hídrica para a população. (MENEZES FILHO; SANTOS, PEREIRA, 2010)

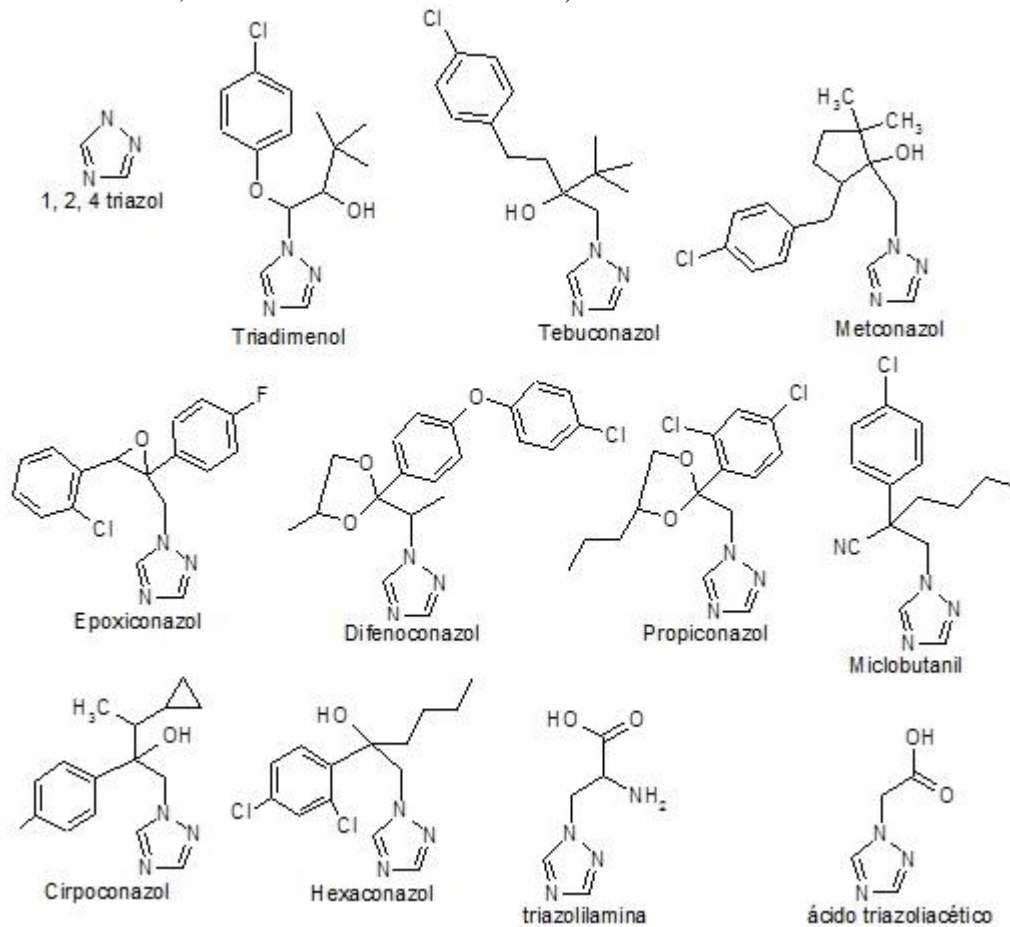
As principais causas de contaminação de fontes de água são a lixiviação e o escoamento, provocado pela ação de água de chuvas ou de irrigação, causando o escoamento dos praguicidas presentes no solo ou nas vegetações. O escoamento aumenta, principalmente, a contaminação de águas superficiais, como águas de represa e lagos, enquanto que a lixiviação aumenta a contaminação de fontes subterrâneas. Assim, praguicidas que se ligam fortemente ao solo são resistentes à volatilização e a degradação, além de escoarem menos, enquanto que aqueles de alta solubilidade em água tendem a se lixiviar mais facilmente. (MENEZES FILHO; SANTOS, PEREIRA, 2010; WERF, 1996)

## 2.2 FUNGICIDAS TRIAZÓLICOS

Os fungicidas triazólicos são caracterizados como uma das classes de praguicidas mais empregada na agricultura de frutas, vegetais e grãos. (KAHLE, 2008) Os agentes azólicos (derivados do imidazol e triazol) são uma família de agentes químicos com ação antifúngica. Eles representam a categoria mais importante de fungicidas devido ao seu elevado poder protetor, erradicante e curativo contra um amplo espectro de doenças agrícolas. (GIAVINI, MENEGOLA, 2010; WU, LEE, LI, 2011)

Os fungicidas triazólicos apresentam em comum uma estrutura central, o anel 1,2,4-triazol, que está conectado a uma estrutura hidrofóbica através da posição 1. Na Figura 1 são apresentados os principais fungicidas triazólicos empregados como praguicidas.

Figura 1 - Compostos triazólicos mais comumente usados na agricultura e seus metabólitos (1, 2, 4 – triazol, triazolamina e ácido triazoliacético).



Fonte: Do autor

A ação antifúngica desta classe se deve a sua capacidade de bloquear a biossíntese do ergosterol, resultando em problemas na formação da parede celular do fungo. Seu mecanismo específico de ação se deve ao rompimento da parede celular do fungo como consequência da inibição da enzima lanosterol-14 $\alpha$ -dimetilase (CYP51) - presente nos fungos. Este mecanismo bioquímico é fundamental na ação desta classe como praguicida na agricultura e na terapia contra micoses nas medicinas humana e veterinária. (GOETZ et al, 2007)

Entretanto, a habilidade desses compostos de alterar a biossíntese de hormônios esteroidais pode resultar em complicações endócrinas para mamíferos, além de alterações nos níveis de colesterol e triglicerídeos e ainda em hepatotoxicidade. (KJAERSTA et al, 2008)

Os efeitos tóxicos ao desenvolvimento embrionário ainda são pouco explicados, mas atribui-se a propriedade dos fungicidas triazólicos em inibir determinadas enzimas do citocromo P450, em especial a CYP26 – enzima expressa durante o desenvolvimento

embrionário – como a principal responsável, ocasionando efeitos teratogênicos. (Rockett et al, 2006).

Como os fungicidas triazólicos são capazes de alterar a expressão do citocromo P450, o metabolismo de fase I é afetado em animais e humanos, resultando em dificuldade para eliminação e acúmulo de xenobióticos. Ainda, as enzimas responsáveis pela biossíntese e catabolismo de hormônios esteroidais, endógenos bioquímicos, vitaminas e outros são comprometidas, resultando em problemas hormonais e endócrinos, como menor produção de hormônios sexuais. (GIAVINI; MENEGOLA, 2010)

Apesar de todos os efeitos tóxicos descritos, deve-se ressaltar que os efeitos teratogênicos foram observados, em laboratório, quando os animais estavam expostos a elevadas doses quando comparadas a doses administradas a humanos para terapia contra micose. Entretanto, baixas doses são suficientes para provocar alterações na atividade do citocromo P450, resultando em outros efeitos tóxicos, como acúmulo de fármacos no organismo humano, como consequência da alteração da capacidade metabólica. (ZARN; BRÜSCHWEILER; SCHLATTER, 2003; GIAVINI; MENEGOLA, 2010)

Devido as suas características químicas, como elevada estabilidade química e fotoquímica, baixa biodegradação e fácil transporte por entre os compartimentos ambientais, eles são resistentes e podem persistir no meio ambiente e na produção agrícola após sua aplicação. Estas características, aliada a sua alta toxicidade aos humanos e animais, fez com que diversos triazólicos fossem incluídos na lista de substâncias potencialmente relacionadas com doenças endócrinas, da União Europeia. (PINTO, 2010; KAHLE, 2008) Além disso, em 2002, a Agência de Proteção ao Ambiental dos Estados Unidos (US EPA), criou o USTTF (do inglês: *United States Triazole Task Force*), com o auxílio das empresas as empresas Bayer CropScience LP, Dow AgroSciences, Spicam Agro USA, Syngenta Crop Protection e BASF, para obter dados para a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos, com a finalidade de assegurar a utilização segura desses compostos.

No Brasil, dentre os fungicidas triazólicos apresentados acima, o epoxiconazol está presente em 21 formulações comercialmente disponíveis, como ingrediente químico único (princípio ativo) na formulação ou em associação com outros praguicidas. O metconazol está presente em 2, o triadimenol em 9 e o tebuconazol em 41 formulações, todas classificadas entre média a extremamente tóxico, com médio a alto grau de perigo ao meio ambiente. (SISTEMAS DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS – AGROFIT)

O sul do estado de Minas Gerais é economicamente caracterizado pelo extensivo cultivo do café. Consequentemente, uma grande quantidade de praguicidas tem sido utilizada

no combate a doenças comumente presentes nessa cultura como a ferrugem, cercosporiose, rhizoctoniose, antracnose, mancha manteigosa, queima do frio, seca-dos-ponteiros, entre outros, com um consumo médio de 10 litros de praguicidas por hectare de plantação. (EMBRAPA; CARNEIRO et al, 2012). Algumas plantações encontram-se às margens de córregos e rios que quase sempre desembocam na represa de Furnas. Dessa forma, as contaminações ocorrem principalmente pela ação das águas da chuva e de irrigação que provocam lixiviação, drenagem e escoamento dos praguicidas presentes nas plantações e no solo, os quais irão atingir correntes de água ou reservatórios. Esse fato resulta em efeitos tóxicos para a fauna e flora aquáticas e também para a saúde humana, devido à utilização da água para consumo e práticas de lazer. (KAHLE et al, 2008)

Como estes praguicidas apresentam toxicidade aos humanos, eles foram categorizados, pela Organização Mundial de Saúde, de acordo com seu grau de toxicidade, baseado na exposição oral aguda e na toxicidade dérmica destes compostos a ratos de laboratório. Assim, eles são classificados como extremamente perigosos (classe Ia), como altamente perigosos (classe Ib), moderadamente perigosos (classe II) e como ligeiramente perigosos (classe III). (PINHEIRO; DA SILVA; KRAISCH, 2010)

A toxicidade de um praguicida é dada normalmente por meio da dose ou concentração que causa um efeito deletério específico em 50% da população de estudo ( $EC_{50}$  ou  $ED_{50}$ ). Quando esse efeito é a morte, o parâmetro empregado é a dose letal 50 ( $DL_{50}$ ) ou a concentração letal 50 ( $CL_{50}$ ). (PINHEIRO; DA SILVA; KRAISCH, 2010)

Abaixo são apresentadas as características físico-químicas e toxicológicas dos fungicidas triazólicos empregados neste estudo, com base em informações da ANVISA, do Programa de Análise de Resíduo de Agrotóxicos (PARA), TOXNET e ChemSpider. As estruturas químicas de todos os compostos são apresentados na Figura 1.

### 2.2.1 Triadimenol

- a) **Nº CAS:** 55219-65-3;
- b) **Nome químico (IUPAC):** (1RS,2RS;1RS,2SR)-1-(4-clorofenoxi)-3,3-dimetil-1-(1H-1,2,4-triazol-1-il)butan-2-ol;
- c) **Fórmula Química:**  $C_{14}H_{18}ClN_3O_2$ ;
- d) **Peso Molecular:** 295,768 Da;

- e) **Classificação toxicológica:** Classe II: moderadamente perigoso;
- f) **Ingestão Diária Aceitável (IDA):** 0,05 mg.kg<sup>-1</sup> p.c.;
- g) **DL<sub>50</sub> Oral (rato):** 689 mg.kg<sup>-1</sup>;
- h) **DL<sub>50</sub> Tópica (rato):** maior que 5000 mg.kg<sup>-1</sup>;
- i) **DL<sub>50</sub> Inalatória (rato):** maior que 1.56 mg.L<sup>-1</sup>;
- j) **Ponto de Fusão:** 124 °C;
- k) **Ponto de Ebulição:** 465,4±55.0 °C a 760 mmHg;
- l) **Log P:** 2,9;
- m) **Solubilidade em água:** 120 mg.mL<sup>-1</sup> a 20 °C;
- n) **Solubilidade em solvente orgânico:** diclorometano >250 g.L<sup>-1</sup>; acetona 190 g.L<sup>-1</sup>; acetonitrila 60 g.L<sup>-1</sup>; acetato de etila 150 g.L<sup>-1</sup>;
- o) **Pressão Vapor:** 0,0±1.2 mmHg a 25°C.

### 2.2.2 Tebuconazol

- a) **Nº CAS:** 107534-96-3;
- b) **Nome químico (IUPAC):** 1-(4-Clorofenil)-4,4-dimetil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmethyl)-3-pentanol;
- c) **Fórmula Química:** C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>ClN<sub>3</sub>O;
- d) **Peso Molecular:** 307,8228 Da;
- e) **Classificação toxicológica:** Classe III: ligeiramente perigoso;
- f) **Ingestão Diária Aceitável (IDA):** 0,03 mg.kg<sup>-1</sup> p.c.;
- g) **DL<sub>50</sub> Oral (rato):** 1615 mg.kg<sup>-1</sup>;
- h) **DL<sub>50</sub> Dérmica (rato):** maior que 5000 mg.kg<sup>-1</sup>;
- i) **Ponto de Fusão:** 102,4 °C;
- j) **Ponto de Ebulição:** 476,9±55.0 °C a 760 mmHg;
- k) **Log P:** 3,7;
- l) **Solubilidade em água:** 36 mg.L<sup>-1</sup> a 20 °C;
- m) **Solubilidade em solvente orgânico:** acetonitrila 89 g.L<sup>-1</sup>; acetona >200 g.L<sup>-1</sup>; diclorometano >200 g.L<sup>-1</sup>;
- n) **Pressão Vapor:** 0,0±1.3 mmHg a 25°C.

### 2.2.3 Metconazol

- a) **Nº CAS:** 125116-23-6;
- b) **Nome químico (IUPAC):** (1RS,5RS;1RS,5SR)-5-(4-clorobenzil)-2,2-dimetil-1-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmethyl)ciclopentanol;
- c) **Fórmula Química:** C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>3</sub>O;
- d) **Peso Molecular:** 319,834 Da;
- e) **Classificação toxicológica:** Classe Ia: extremamente perigoso;
- f) **Ingestão Diária Aceitável (IDA):** 0,048 mg kg<sup>-1</sup> p.c.;
- g) **DL<sub>50</sub> Oral (rato):** 566 mg.kg<sup>-1</sup>;
- h) **DL<sub>50</sub> Oral (rato):** >566 mg.kg<sup>-1</sup>;
- i) **Ponto de Fusão:** 111,5 °C;
- j) **Ponto de Ebulição:** 469,1±41.0 °C a 760 mmHg;
- k) **Log P:** 3,85;
- l) **Solubilidade em água:** 15 mg.L<sup>-1</sup>
- m) **Solubilidade em solvente orgânico:** diclorometano 481 g.L<sup>-1</sup>; metanol 403 g.L<sup>-1</sup>; acetona 363 g.L<sup>-1</sup>; acetato de etila 260 g.L<sup>-1</sup>;
- n) **Pressão Vapor:** 0,0±1.2 mmHg a 25°C.

### 2.2.4 Epoxiconazol

- a) **Nº CAS:** 135319-73-2;
- b) **Nome químico (IUPAC):** (2RS,3SR)-1-[3-(2-clorofenil)-2,3-epoxi-2-(4-fluorofenil) propil]-1H-1,2,4-triazol;
- c) **Fórmula Química:** C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>ClFN<sub>3</sub>O;
- d) **Peso Molecular:** 329,7607 Da;
- e) **Classificação toxicológica:** Classe III: ligeiramente perigoso;
- f) **Ingestão Diária Aceitável (IDA):** 0,03 mg kg<sup>-1</sup> p.c.;
- g) **DL<sub>50</sub> Oral (rato):** 3160 mg.kg<sup>-1</sup>;
- h) **DL<sub>50</sub> Dérmica (rato):** maior que 2000 mg.kg<sup>-1</sup>;
- i) **DL<sub>50</sub> Inalatória (rato):** 5.3 mg.L<sup>-1</sup>;
- j) **Ponto de Fusão:** 102,4 °C;

- k) **Ponto de Ebulição:**  $463,1 \pm 55,0$  °C a 760 mmHg;
- l) **Log P:** 3,44;
- m) **Solubilidade em água:**  $9,45 \text{ mg.L}^{-1}$ ;
- n) **Solubilidade em Solventes Orgânicos:** acetona  $144 \text{ g.L}^{-1}$ ; acetonitrila  $70 \text{ g.L}^{-1}$ ; acetato de etila  $98 \text{ g.L}^{-1}$ ; metanol  $28 \text{ g.L}^{-1}$ ; diclorometano  $291 \text{ g.L}^{-1}$ ;
- o) **Pressão Vapor:**  $0,0 \pm 1,1$  mmHg a 25°C.

### 2.3 REGULAMENTAÇÃO E LIMITES DE EXPOSIÇÃO AOS PRAGUICIDAS

Como a presença destes agentes no solo, água ou ar pode provocar efeitos nocivos à saúde pública ou ao meio ambiente, com impactos imediatos ou a longo prazo, fazem-se necessárias legislações específicas para sua produção, aplicação e controle visando minimizar os efeitos adversos.

Neste sentido, a principal lei acerca dos praguicidas é o decreto presidencial número 4.074, de 4 de Janeiro de 2002 que dispõe, entre outros itens, sobre pesquisa, produção, comércio, destino final dos resíduos, inspeção e fiscalização. Este documento distribui a função de fiscalização e de estabelecer limites máximos de resíduos aos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Saúde (MS) e do Meio Ambiente (MMA), no âmbito de suas respectivas áreas de competências. (BRASIL, 2002)

O MS, em sua portaria número 2.914 de 12 de dezembro de 2011 dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Neste texto, são estabelecidos limites específicos para 27 praguicidas, entre eles o tebuconazol, fungicida presente neste estudo, com valor máximo permitido de  $180 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ . (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011)

Outra importante diretriz relacionada a qualidade da água é apresentada pela Comunidade Europeia na DIRECTIVE 2006/118/EC na qual é estipulado como Limite Máximo Tolerável (LMT) em água a presença de  $0,1 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  para cada praguicida e de  $0,5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  para um total deles. (European Parliament, 2006)

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão responsável pelo controle e concessão de registro, reavaliação de moléculas já registradas e



fiscalização dos riscos destes agentes relacionados à saúde humana, estabelecendo assim os Limites Máximos de Resíduos (LMR) destes compostos. (ANVISA, 2015)

Desse modo, a ANVISA criou o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos nos Alimentos (PARA), no qual determina limites específicos para diversas culturas de acordo com os praguicidas permitidos em cada cultura e realiza coletas aleatórias de alimentos e análise dos possíveis resíduos. Por exemplo, para a cultura de uva, os praguicidas triadimenol, tebuconazol, e metconazol – alvo deste estudo - apresentam limite máximo de resíduo de 0,10, 2,0 e 1,0 mg.Kg<sup>-1</sup>, respectivamente, enquanto que o epoxiconazol não é permitido para tal cultura. (ANVISA, 2015)

Segundo relatório parcial do PARA de 2012, em que 26 culturas foram analisadas, com um total de 3.062 amostras, 25 % do total se apresentaram como insatisfatórias, com resíduo em quantidades acima do LMR ou devido a detecções de determinados praguicidas em culturas onde ele não é autorizado. Dos 75 % de amostras satisfatórias, 42 % apresentaram resíduos dentro do permitido e apenas 33 % do total de amostras estavam contaminadas por praguicidas. (ANVISA, 2014).

Por outro lado, o monitoramento de praguicidas em águas de abastecimento e águas superficiais, no Brasil, ao contrário do que ocorre em países desenvolvidos, não é realizado com a mesma frequência e eficiência, de modo que as qualidades destas fontes hídricas não podem ser mensuradas antes do consumo humano. Entre outros motivos, a escassez de análises se dá por ausência de infraestrutura laboratorial adequada (necessidade de instrumentação analítica avançada, como cromatografia acoplada a espectrometria de massas), altos custos das análises e necessidade de profissionais especializados. (PINHEIRO; DA SILVA; KRAISCH, 2010)

Neste sentido, alguns trabalhos recentes descrevem metodologias para análise destes contaminantes através de diferentes técnicas de extração, com análise instrumental por cromatografia. Chun Wang et al desenvolveram uma microextração líquido-líquido com solvente dispersante para avaliar a contaminação de amostras de água. Nesta metodologia, partindo de 10 mL de amostra e 12 µL de solvente de extração (1-dodecanol) e análise instrumental por cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos, os autores realizaram a determinação de tebuconazol, triadimenol, hexaconazol e miclobutanil em uma faixa analítica de 0,5 a 200 µg.L<sup>-1</sup>. (WANG, 2011)

Em 2011, A.R. Fontana et al desenvolveram uma metodologia de extração em fase sólida com cartuchos Oasis HBL e análise por cromatografia líquida acoplada a analisador de massas do tipo tempo de voo para a determinação de fungicidas em amostras de vinho – entre

os fungicidas analisados se destacam os triazólicos diniconazol, difenoconazol, flusilazol, penconazol, propiconazol, tebuconazol e triadimenol. Os autores obtiveram valores de quantificação na faixa de 0,2 a 1,7  $\mu\text{g.L}^{-1}$  partindo de 10 mL de amostra. (FONTANA, 2011)

Em outro trabalho, Almeida e Nogueira desenvolveram um estudo de microextração em fase sólida com barra sortiva, avaliando-se diferentes fases sorbentes, com análise instrumental por GC-MS. Dentre os 10 fungicidas analisados em amostras de água de torneira e água subterrânea, destacam-se os triazólicos difenoconazol, penconazol, tebuconazol, flusilazol e miclobutanil. Esta metodologia desenvolvida obteve limites de quantificação na ordem de 1,0 a 2,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , em uma faixa analítica até 100 ou 250  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . (ALMEIDA, 2012)

## 2.4 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM DISCO

A determinação de compostos em níveis residuais em amostras complexas, como matrizes biológicas, alimentos e águas de abastecimento, geralmente requer um extenso preparo das amostras antes da quantificação por instrumentos analíticos. A quantidade de etapas necessária no preparo da amostra depende das características da matriz, das propriedades físico-químicas e concentração do analito. Além disso, na determinação de níveis residuais, a análise é realizada através de poderosas técnicas de separação e detecção, como cromatografia e eletroforese capilar, acoplados a detectores/analísadores como UV-vis e espectrometria de massas. (RIDGWAYA; LALLJIEA; SMITH, 2007)

As principais técnicas para extração e pré-concentração de compostos orgânicos presentes em amostras complexas são a extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida (SPE) e as técnicas derivadas a partir destas duas, como a extração em disco, a microextração em fase sólida (SPME) e a microextração com sorbente empacotado (MEPS).

Na ELL os analitos migram por partição da amostra para a fase imiscível, devido a polaridade do solvente utilizado. A eficiência da extração depende da afinidade dos analitos pelo solvente de extração, da razão entre as fases e do número de etapas de extrações. Esta técnica apresenta a vantagem de ser relativamente simples e permitir utilizar um número grande de solventes, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade. Por outro lado, a ELL possui uma série de desvantagens, tais como: necessidade de solventes ultrapuros, formação de emulsão e consumo de volumes grandes de solvente orgânico, os

quais são tóxicos ao meio ambiente, entre outras. (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2011; RIDGWAYA; LALLJIEA; SMITH, 2007)

Já a SPE emprega sorbentes fixados em cartuchos de extração e os mecanismos de retenção são idênticos àqueles envolvidos em cromatografia líquida em coluna. Ela possui uma grande quantidade de materiais sorbentes disponíveis comercialmente, sendo empregada para a extração de diversos compostos. Além disso, apresenta um consumo muito menor de solventes orgânicos, quando comparada a ELL tradicional. Contudo, a SPE apresenta como desvantagem a grande quantidade de variáveis que necessitam ser otimizadas, elevado custo por amostra e maior tempo gasto no processo de extração. (LANÇAS, 2004; COSTA, 2008)

Outra alternativa ao uso de cartuchos de extração em fase sólida foi o desenvolvimento de discos semelhantes a membranas utilizadas em sistemas de filtração. Geralmente esses discos são constituídos de matrizes inertes de PTFE (teflon) flexível, embebidas ou impregnadas com o sorbente. (LANÇAS, 2004; COSTA, 2008; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2011)

As dimensões de um disco típico são de 4 a 96 mm de diâmetro e 0,5 mm de espessura, contendo até 500 mg de sorvente, por exemplo, partículas de C-8 ou C-18, de 8 µm de diâmetro de partícula e 6 nm de poro, imobilizadas no suporte. O diâmetro do disco é escolhido de acordo com o volume de amostra a ser percolado por ele. (LANÇAS, 2004; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2011)

O sorbente mais empregado em extrações em disco é a sílica ligada a C-18 (octadecil), amplamente utilizada para a extração de compostos apolares. Quando a finalidade é a determinação de moléculas polares, polímeros a base de divinilbenzeno são mais empregados. Com isso, devido a grande variedade de fases estacionárias, diferentes seletividades podem ser obtidas, permitindo seu emprego em diferentes fins analíticos, desde inseticidas organofosforados a hidrocarbonetos aromáticos. (LANÇAS, 2004)

A extração em discos foi inicialmente desenvolvida para possibilitar a extração de grandes volumes de amostras sem que houvesse entupimento da fase extratora por partículas em suspensão ou componentes da matriz. Assim, a dimensão do disco de extração é proporcional ao volume de amostra, sendo os discos menores empregados em análises de amostras biológicas e os maiores em amostras ambientais. Sob esse ponto de vista, a extração em disco mostra grande importância nas análises toxicológicas com enfoque ambiental, principalmente para a extração de toxicantes orgânicos presentes na água. (LANÇAS, 2004; COSTA, 2008; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2011)

Os discos apresentam uma série de vantagens devido ao seu formato, tais como leito mais homogêneo, pressões menores durante a aplicação da amostra e na eluição dos analitos, ausência de caminhos preferenciais, maior capacidade de extração, trabalho com elevados volumes de amostra e vazões mais altas. Entretanto, sua maior desvantagem é que a etapa de condicionamento é mais crítica, pois, devido à grande área superficial, uma interface água/ar pode ser formada, se o disco secar, resultando em um decréscimo das recuperações. (LANÇAS, 2004; COSTA, 2008; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2011)

## 2.5 NANOTUBOS DE CARBONO

Atualmente a nanotecnologia é uma das tendências mais importantes na ciência, representando uma tecnologia chave para o desenvolvimento de materiais avançados em seus diversos ramos. Com a nanotecnologia foi possível o desenvolvimento de um produto novo e revolucionário com tamanho na ordem de 100 nm ou menos – os nanotubos de carbono - CNT. (RAVELO-PÉREZ, 2010)

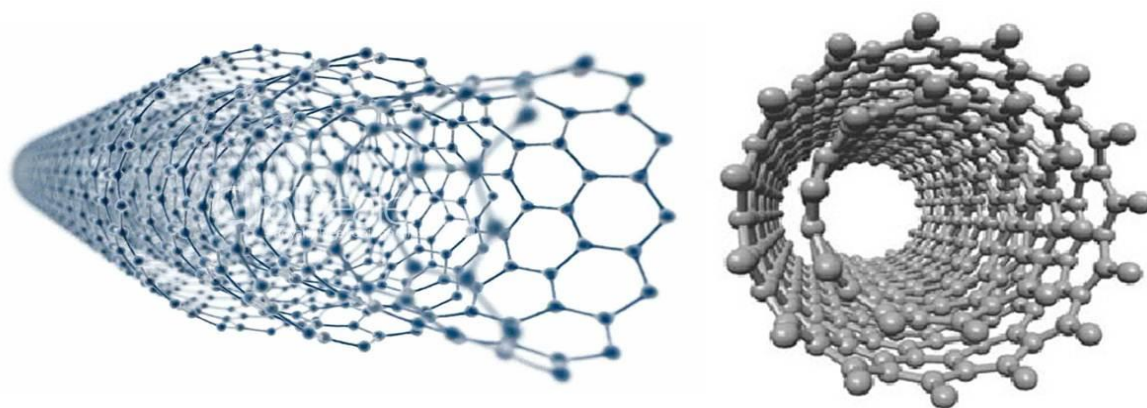
Os CNT são materiais ociosos, no formato de uma folha de grafite enrolada sobre seu próprio eixo, formando um tubo em nano-escala. São compostos por uma ou múltiplas camadas de lâminas de grafite organizadas sobre um mesmo eixo denominados, respectivamente, única lâmina de CNT (*single-walled carbon nanotubes* – SWCNT) ou várias lâminas de CNT (*multi-walled carbon nanotubes* – MWCNT). A dimensão dos CNT varia de algumas centenas de nanômetros a vários micrômetros de comprimento enquanto o diâmetro varia de 1 a 10 nm e 5 a 200 nm para SWCNT e MWCNT, respectivamente. (LATORRE, 2012) A Figura 2 ilustra a estrutura tridimensional do MWCNT, o qual, de um modo geral, apresenta maior capacidade sorbiva frente ao SWCNT por apresentar mais camadas de carbono em seu interior e conseqüentemente maior área superficial e maior número de pontos para possíveis interações analito-CNT.

Atualmente, são descritos três modos principais para a síntese dos CNT: descarga elétrica, corte por laser ou deposição por vapor químico, sendo este último o mais promissor por produzir materiais com menor dimensão e alto rendimento e pureza. (RAVELO-PÉREZ, 2010; DURAN; TUZEN; SOYLAK, 2010)

As estruturas dos nanotubos podem apresentar suas extremidades abertas ou obstruídas, de acordo com o procedimento de síntese – a extremidade permanece obstruída

após a síntese devido a resquícios de impurezas remanescentes da síntese. Por isso, ao final da síntese são empregadas etapas de purificação para remover estas impurezas remanescentes, que podem obstruir os poros, impedindo o acesso de amostras ao seu interior. (LATORRE; 2012; DURAN; TUZEN; SOYLAK, 2010).

Figura 2 - Estruturas tridimensionais dos nanotubos de carbono compostos por múltiplas camadas.



Fonte: Toxicidade dos nanotubos: meio ambiente e saúde esperam respostas. Disponível em: <[http://lqes.iqm.unicamp.br/canal\\_cientifico/pontos\\_vista/pontos\\_vista\\_divulgacao56-1.html](http://lqes.iqm.unicamp.br/canal_cientifico/pontos_vista/pontos_vista_divulgacao56-1.html)>. Laboratório de Química do Estado Sólido. Unicamp. Acesso em: 4 fev. 2015.

Os CNT apresentam diversas características físico-químicas que permitem seu uso em diversas áreas da ciência. São amplamente usados em química analítica como materiais sorbentes empregados no preparo de amostras para a pré-concentração de analitos e limpeza das amostras, como pode ser observado em diversos artigos de revisão de literatura. (LATORRE, 2012; DURAN; TUZEN; SOYLAK, 2010)

Esse potencial analítico como material para extração em fase sólida se deve as suas características físico-químicas como elevada área superficial e elevado volume interno, estabilidade e resistência mecânica, química e térmica, possibilidade de estabelecer interações  $\pi$ - $\pi$  com diversas moléculas, entre outras, o que permite a pré-concentração e separação de analitos tanto polares como apolares – destaca-se que a característica fundamental para sua alta capacidade adsortiva é a combinação de pequeno tamanho com elevada capacidade adsortiva. (NIU, 2007; ASENSIO-RAMOS, 2009; FANG; HE; WANG, 2006)

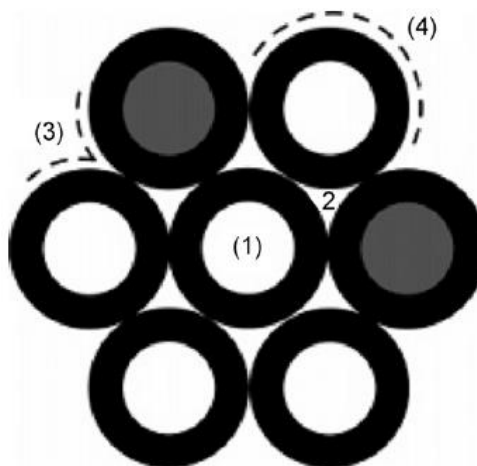
Desse modo, a capacidade sortiva dos CNT é influenciada pelos seguintes fatores: i) densidade de sítios disponíveis – os MWCNT apresentam maior número de sítios comparados ao SWCNT, ii) se a extremidade dos CNT se apresentam abertas ou fechadas, iii) área

superficial – quanto maior a quantidade de feixes enrolados sobre um mesmo eixo maior será sua área superficial, iv) pureza do CNT, v) presença de grupos funcionais na superfície externa e vi) porosidade. (ASENSIO-RAMOS, 2009; LI, 2012)

A seletividade dos CNT é similar a de outros materiais a base de carbono, porém, sua característica de pequeno tamanho e elevado volume interno confere uma capacidade adsortiva notavelmente maior, em especial para os MWCNT. Suas características estruturais e propriedades eletrônicas permitem a formação de interações fortes com moléculas orgânicas por interações não covalentes (interação  $\pi$ - $\pi$ , eletrostáticas, van der Waals e hidrofóbicas). Ainda, sua estrutura hexagonal composta por átomos de carbono oferece uma interação forte com moléculas contendo anéis benzeno e aromáticos em sua estrutura. (RAVELO-PÉREZ, 2010; ASENSIO-RAMOS, 2009; FANG; HE; WANG, 2006)

A interação do analito de interesse com o CNT pode ocorrer em diferentes regiões, conforme ilustrado na Figura 3. Os analitos podem estabelecer interações, primeiramente, (I) no interior dos nanotubos – acesso permitido apenas quando as extremidade são abertas, (II) nos canais intersticiais formados pela presença de vários nanotubos próximos um ao outro, (III) nas ranhuras formadas entre nanotubos vizinhos ou na (IV) superfície externa.

Figura 3 - Diferentes regiões onde é possível ocorrer a interação do analito com os CNT.



Fonte: Chemical Engineering Journal 170 (2011) 395–410.

Os CNTs podem ser estruturalmente modificados a fim de se aumentar sua seletividade frente a determinadas moléculas ou para se aumentar sua capacidade adsortiva. Nesta vertente, alguns tratamentos se destacam. Primeiro, a oxidação do material, o mais

simples e usado método de modificação, no qual os CNT são oxidados por reação com ácidos, ozônio e plasma resultando na abertura de suas extremidades (aumento de área superficial) e introdução de grupos orgânicos contendo oxigênio em sua estrutura (como grupos carboxilas), o que resulta em aumento da solubilidade deste material e maior seletividade para compostos polares. Uma segunda alternativa é o tratamento térmico, realizado através do aquecimento em estufa do CNT, que tem por finalidade degradar os grupos funcionais de reagentes de síntese que possam obstruir a entrada dos nanotubos, ocasionando a abertura de nanotubos fechados e, conseqüente, aumento de área superficial. Além disso, a superfície externa dos CNT pode ser química ou fisicamente modificada pela adição de grupamentos químicos específicos ou revestimento com polímeros ou biomoléculas com o propósito de aumentar sua seletividade frente a analitos específicos ou para impedir seu contato com determinados materiais, como no revestimento dos CNTs para impedir seu contato com as proteínas do sangue humano. (RAVELO-PÉREZ, 2010; ASENSIO-RAMOS, 2009; FANG; HE; WANG, 2006; Li,2012)

Como pode ser observado na literatura, os nanotubos de carbono têm sido amplamente empregados como material de extração em fase sólida, principalmente para a determinação de metais em amostras ambientais.(NIU, 2007; LATORRE, 2012; FANG; HE; WANG, 2006) Sua primeira aplicação para compostos orgânicos foi como material sorbente em SPE para a determinação de Bisfenol-A e outros toxicantes em amostras de água, atingindo recuperações da ordem de 102,8 %. Eles podem ser empregados em diversos formatos como cartuchos, discos, fibras, barras de agitação, fase sólida dispersiva e/ou combinado com outras aplicações, como polímeros de impressão molecular (MIP) e partículas magnéticas. Ainda assim, há uma grande área de aplicação para este material na química analítica ainda desconhecida, como na extração de compostos orgânicos em matrizes biológica e ambiental. (HOU, 2014; PYRZYNSKA, 2011; RAVELO-PÉREZ, 2010)

Como exemplo de aplicação, Asensio-Ramos et al realizaram análise de sete inseticidas organofosforados e uma triazina em diferentes tipos de amostra de solo através da extração em fase sólida empregando 100 mg de MWCNT como fase estacionária e detecção por cromatografia gasosa com detector de nitrogênio e fósforo, atingindo assim, limites de detecção para alguns analitos na ordem de 2,97 a 9,49 ng.g<sup>-1</sup>. (ASENSIO-RAMOS, 2009)

Em outro exemplo de aplicação, Xue Hou et al desenvolveram uma metodologia de extração modificando a técnica de QuEChERS, empregando 6 mg de MWCNT para uma extração em fase sólida dispersiva, na análise de resíduos de 78 praguicidas por cromatografia gasosa acoplada a analisador de espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo. O

método possibilitou a quantificação deste compostos em amostra de chá com limites inferiores de quantificação de até  $0,001 \text{ mg.kg}^{-1}$ . (HOU, 2014)

## 2.6 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Diversas técnicas de separação e quantificação têm sido empregadas para a determinação de fungicidas triazólicos após a etapa de preparo de amostras. As técnicas descritas na literatura são teste de imunoensaio, cromatografia líquida, cromatografia gasosa, espectrometria de massas e eletroforese capilar. (PYRZYNSKA, 2011; LI, 2012; ALI; ASSADI; WAW, 2012; BARAHONA, 2010)

Dentre os modernos métodos de análise química, a cromatografia ocupa um lugar de merecido destaque no que se refere à separação, identificação e quantificação de substâncias químicas. A cromatografia é um método físico-químico de separação, no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases: uma fase fixa (fase estacionária) e a outra um fluido que passa através dela (fase móvel). (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2007; LANÇAS, 1993)

Gases ou substâncias volatilizáveis podem ser separados utilizando-se a cromatografia em fase gasosa. Nesta técnica, a amostra é introduzida no interior de uma coluna cromatográfica e através do uso de temperaturas convenientes, no local de injeção e na coluna cromatográfica, a amostra é vaporizada e, de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária, são retidas por tempos determinados e chegam ao detector em valores de tempo diferentes. (SCOTT, 1998; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2007; LANÇAS, 1993)

A cromatografia gasosa é uma técnica com um alto poder de resolução, permitindo a análise de dezenas de substâncias diferentes. Além disso, apresenta baixos limites de detecção que podem atingir até picogramas. (SCOTT, 1998; LANÇAS, 1993)

A hifenação da técnica de cromatografia gasosa com analisadores de espectrometria de massas apresenta diversas vantagens, como a elevada seletividade, limites de detecção ainda mais inferiores, análise simultânea de moléculas que possam coeluir (minimiza coeluição) e confirmação da identidade dos analitos através do perfil de fragmentação e tempo de retenção. (SCOTT, 1998; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2007)



### 3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

#### 3.1 JUSTIFICATIVA

Nos dias de hoje, é reconhecida a importância da aplicação de praguicidas na lavoura para o controle de doenças, de modo a se obter uma produção que atenda as necessidades da população. Entretanto, como consequência do uso indiscriminado e abusivo destes agentes químicos, pode ocorrer acúmulo destes no solo, nas águas que circundam as plantações e em lençóis freáticos, em alimentos e até mesmo em seres vivos. Em face ao exposto, órgãos regulatórios como a ANVISA no Brasil, FDA (*Food and Drug Administration*) nos Estados Unidos e Comissão Europeia do Meio Ambiente criaram programas de análise de resíduos para avaliação da contaminação de alimentos e fontes hídricas.

Sendo assim, o principal objetivo deste trabalho é desenvolver um disco impregnado com CNT para a extração de fungicidas triazóis em amostras de água e avaliar os níveis de contaminação de pontos específicos da represa de Furnas por praguicidas triazólicos.

#### 3.2 OBJETIVOS

- a) Desenvolver uma metodologia que permita imobilizar os nanotubos de carbono em discos para a etapa de preparo de amostra;
- b) Desenvolver uma técnica analítica para a separação e quantificação de fungicidas triazólicos através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas;
- c) Desenvolver uma técnica de extração de fungicidas triazólicos em extração em disco com nanotubos de carbono;
- d) Avaliar a capacidade de retenção e concentração dos CNT;
- e) Realizar a caracterização morfológica dos CNT e avaliar a necessidade de alterações físicas ou químicas de sua superfície para maior concentração dos analitos;
- f) Validar a metodologia desenvolvida;
- g) Aplicar a metodologia para a extração/separação/quantificação de fungicidas triazólicos em amostras de água da represa de Furnas (região de Alfenas);
- h) Correlacionar os resultados obtidos com os da legislação vigente.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 INSTRUMENTAÇÃO

As amostras de água da represa de Furnas foram analisadas em um cromatógrafo a gás acoplado ao analisador de espectrometria de massas GC-MS QP-2010 da Shimadzu® Corporation (Kioto, Japão), usando para a separação dos analitos uma coluna cromatográfica capilar RTX®-5MS da Restec® com dimensões de 30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm (Bellefonte, EUA).

Para a impregnação dos nanotubos de carbono em papel filtro foi utilizado um banho de ultrassom USC1400 da Unique® (Indaiatuba, Brasil), chapa de agitação da Quimis® (Diadema, Brasil), sistema de filtração da Millipore® (Bedford, EUA) e bomba a vácuo da New Pump® (Heidelberg, Alemanha).

A água ultrapura foi produzida pelo sistema de filtração Milli-Q® da Millipore® (Bedford, EUA). Os eluatos das extrações foram secos em um concentrador de amostras CentriVap Concentrator da Labconco Corporation (Kansas, EUA) com coletor de solvente CentriVap Trap da Labconco Corporation (Kansas, EUA). Nos estudos iniciais com os CNT foi utilizado o sistema de extração a vácuo Manifold da Supelco® (Bellefonte, EUA.)

### 4.2 MATERIAIS, REAGENTES E SOLUÇÕES

Empregou-se os MWCNT com diâmetro externo de 6 a 9 nm e comprimento de 5 µm, adquiridos da Sigma Aldrich® (Steinheim, Alemanha).

Os padrões triadimenol (98.5%), tebuconazol (99.6%), epoxiconazol (99.2%) e metconazol (99.5%) foram produzidos pela Sigma Aldrich® (Steinheim, Alemanha) e a partir deles, preparadas as soluções estoque a 1000 µg.mL<sup>-1</sup> em metanol.

Para o desenvolvimento da metodologia analítica foi preparada uma solução padrão em metanol, uma com os 4 analitos e a outra com triadimenol + tebuconazol + epoxiconazol + metconazol, ambos na concentração de 1000 µg.mL<sup>-1</sup>. Estas soluções foram diretamente adicionada as amostras de água para fortificação.

Para a etapa de validação, foi preparada uma solução padrão em água com os analitos triadimenol + tebuconazol + epoxiconazol na concentração de  $5,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e uma solução de padrão interno metconazol em água na concentração  $4,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

As soluções padrão preparadas em metanol foram armazenadas em frascos âmbar em freezer a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ , sendo retiradas apenas no momento da análise. As soluções padrão preparadas em água foram armazenadas em frasco âmbar em refrigerador e também foram retiradas apenas no momento do uso, sempre tomando o cuidado de espera-las atingir a temperatura ambiente antes do uso.

Os solventes metanol (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha), acetato de etila (Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil) e acetona (Honeywell®, Muskegon, Estados Unidos) são grau de pureza HPLC, enquanto o ácido nítrico 65,0% (Merck®, Hohenbrunn, Alemanha) e o Triton-X 100 (Proquimios®, Rio de Janeiro, Brasil) são grau de pureza P.A. O papel filtro de celulose utilizado apresenta gramatura de  $80 \text{ g/m}^2$ , com  $0,16 \text{ mm}$  de espessura (Unifil®).

#### 4.3 FORTIFICAÇÃO DA AMOSTRA

As amostras de água da represa de Furnas foram coletadas em frasco de vidro âmbar e armazenadas em geladeira até o momento do uso, tomando-se a precaução de espera-la atingir a temperatura ambiente antes da análise.

As amostras utilizadas no desenvolvimento do método foram preparadas usando-se como matriz a água obtida diretamente da torneira, sem prévio tratamento. A ela foi adicionada solução padrão dos analitos, preparados em metanol.

As amostras empregadas na etapa de validação foram preparadas usando-se como matriz água coletada da represa de Furnas, em frascos âmbar, em pontos de coleta afastados de plantações e sempre armazenadas em refrigerador até o momento do uso. A elas foram adicionadas a solução padrão dos analitos triadimenol, epoxiconazol e tebuconazol, preparados em água, sem prévia etapa de preparo (como filtração). Após a fortificação, o volume de amostra a ser analisado foi medido e a ele adicionado a alíquota de  $500 \mu\text{L}$  de padrão interno metconazol, preparado em água.

Antes do processo de fortificação da amostra, uma alíquota destas amostras foi submetida ao processo de extração e análise por GC-MS para confirmar a ausência dos analitos de interesse.

#### 4.4 IMPREGNAÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO EM MEMBRANA DE CELULOSE

A metodologia de impregnação dos nanotubos de carbono em membrana de celulose consiste, primeiramente, em estabilizar os nanotubos de carbono em uma suspensão com uso de Triton-X 100 a 0,1 % em água. Para isso, pesa-se 15 mg de nanotubos de carbono e adiciona-se esta massa em 50 mL de solução Triton-X 100 a 0,1 %, seguido de sonificação em banho de ultrassom por 15 min e agitação em chapa de agitação por 15 min, a 1.200 rpm.

Em uma segunda e independente etapa, 10 mL de ácido nítrico são aquecidos a 70 °C e transferidos para o sistema de filtração, o qual contém um papel filtro de celulose no seu interior. Após deixar o ácido reagir com o papel por 2 min, a solução de nanotubos de carbono é transferida para o sistema de filtração e a bomba a vácuo é acionada.

Após a passagem da solução contendo os nanotubos de carbono, o disco é lavado com os seguintes reagentes, na ordem expressa: 100 mL de água ultrapura, 20 mL de metanol, 20 mL de acetona e 100 mL de água ultrapura.

Deste procedimento resulta um disco de papel filtro com uma delgada camada de nanotubos de carbono uniformemente distribuídos sobre sua superfície e a ele fortemente aderidos. Este filme de nanotubos se torna fixo ao papel que, então, é utilizado como fase estacionária para um processo de extração em fase sólida em disco, conforme ilustrado e detalhado no item “5.3 Disco Impregnado por Nanotubos de Carbono”.

#### 4.5 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO

O procedimento de extração foi realizado em um sistema de filtração contendo dois discos impregnados, dispostos em série, cobertos com um papel filtro. A extração é composta das seguintes etapas:

- a) Condicionamento do disco com 50 mL de água ultrapura;
- b) Carregamento da amostra, através da passagem de 400 mL de amostra sobre o sistema de filtração;

- c) Eluição dos analitos retidos no disco com 7,0 mL de uma solução de acetato de etila:acetona (1:1, v/v);
- d) Secagem do eluato em concentrador de amostras a vácuo, com aquecimento a 40 °C, para posterior ressuspensão em 130 µL de acetona;
- e) Injeção de 3,0 µL no sistema cromatográfico com análise no modo SIM.

#### 4.6 MÉTODO CROMATOGRÁFICO

A determinação dos fungicidas triazólicos foi realizada através do GC-MS (do tipo monoquadrupolo), com os parâmetros abaixo descritos.

- a) Introdução da amostra: modo *splitless*;
- b) Ionização: fonte de impacto de elétrons, operando a 70 eV;
- c) Gás de arraste: hélio (99,999%), a uma vazão de 1,46 mL.min<sup>-1</sup>;
- d) Temperatura do injetor: 300 °C;
- e) Temperatura da fonte de ionização: 270 °C;
- f) Temperatura da interface: 270 °C;
- g) Coluna cromatográfica com aquecimento no modo gradiente de temperatura: temperatura inicial de 120 °C, aquecimento até 290 °C, a uma taxa de 40 °C.min<sup>-1</sup>, mantendo a 290 °C por 3 min;
- h) Íons monitorados (em **negrito** destacado o íon usado para quantificação, os demais foram usados para confirmação):
  - 1. Triadimenol: **112**, 128, 168;
  - 2. Tebuconazol: **250**, 70, 125;
  - 3. Epoxiconazol: **192**, 138, 165;
  - 4. Metconazol: **125**, 145, 250.

#### 4.7 VALIDAÇÃO

O método analítico proposto foi validado de acordo com os guias internacionais “Guidance document on pesticide residue analytical methods” (SANCO/825/00 rev. 8.1) e

“Regulatory Limits For Pesticide Residues In Water”, publicados, respectivamente pela União Européia e IUPAC. O método desenvolvido foi validado para os parâmetros seletividade, linearidade, limite de quantificação, exatidão e precisão inter e intra-dias.

#### 4.8 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras da represa de Furnas coletadas para a validação da metodologia analítica desenvolvida foram coletadas em frascos de vidro âmbar, em pontos distantes de plantações e pontos onde desembocam esgoto e rios ou córregos. Estas amostras foram armazenadas em geladeira até o momento do uso.

As amostras da represa de Furnas coletadas para a etapa de análise foram coletadas em frasco de vidro âmbar, em pontos próximos a plantações de café, em regiões próximas as cidades de Alfenas e Campos Gerais (regiões de alta produção de café). Estas amostras, após coleta, foram levadas diretamente para análise.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

O método cromatográfico foi baseado em um trabalho previamente publicado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos da Unifal-MG. (FREITAS et al, 2014) Para o desenvolvimento do método cromatográfico, a partir das soluções padrão estoque a  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  em metanol, foram preparados diluições da solução padrão de cada analito individualmente, na concentração de  $1 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ , também em metanol. Estas soluções foram injetadas, individualmente, no sistema cromatográfico com o espectrômetro de massas operando no modo varredura (SCAN), com a finalidade de se obter as informações do perfil de fragmentação de cada analito - análise no modo varredura realizada entre 50 e 400 m/z, para abranger todas as massas moleculares dos analitos em estudo. A Tabela 1 resume as características e os tempos de retenção obtidos para cada analito:

Tabela 1: Resumo das características dos analitos e dos parâmetros qualitativos obtidos.

Analito	Triadimenol	Tebuconazol	Epoconazol	Metconazol
Fórmula molecular	$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}_2$	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{O}$	$\text{C}_{34}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_2$	$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{O}$
Massa molecular	295,76 Da	307,81 Da	329,51 Da	319,82 Da
Íons monitorados	<b>112</b> , 168, 128	70, 125, <b>250</b>	<b>192</b> , 165, 138	<b>125</b> , 145, 250
Tempo de retenção (min)	4,56	5,50	5,63	5,97

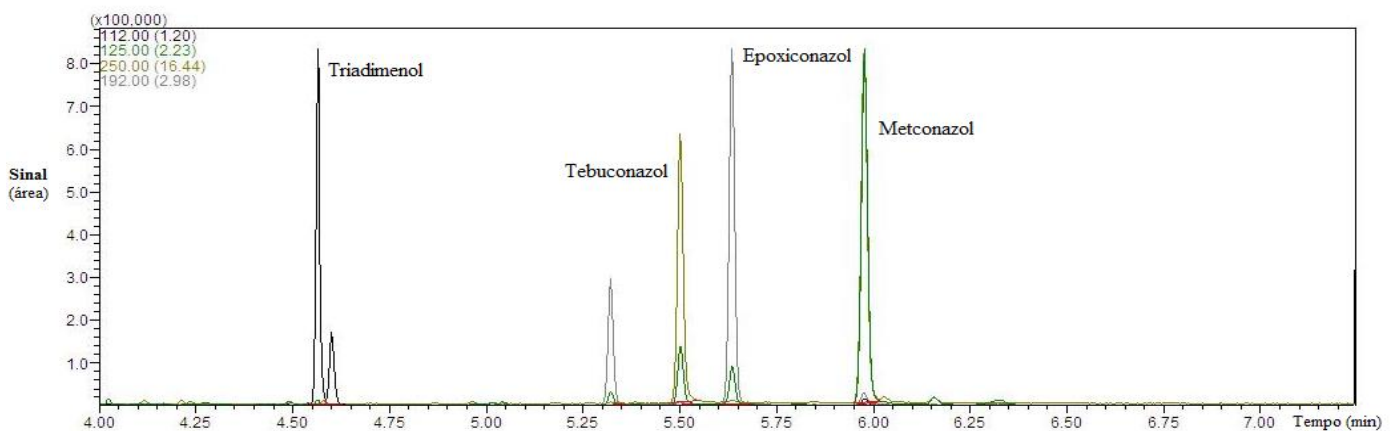
Fonte: Do autor.

A análise quantitativa foi desenvolvida no modo *SIM* (*Selected Ion Monitoring*) – modo de aquisição dos dados em que apenas os íons de interesse são monitoradas, resultando em maior sensibilidade e seletividade. Para esta análise, o íon com maior intensidade de sinal de cada analito foi utilizado para sua quantificação e outros dois íons mais intensos foram usados para confirmar a identidade da molécula, a partir de seu perfil de fragmentação –

conforme preconizado pelos órgãos regulamentadores para análise de praguicidas em amostras complexas.

A Figura 4 representa o cromatograma obtido com a injeção de uma solução padrão preparada em metanol, contendo os 4 analitos na concentração de  $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Este cromatograma foi obtido com o modo de injeção *SIM* e apresenta os 4 íons utilizados para a quantificação dos analitos.

Figura 4 - Cromatograma obtido após a injeção de uma solução padrão em metanol.



Fonte: Do autor.

Nota: Os 4 analitos estão na concentração de  $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e os picos são identificados na figura.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL

Com a finalidade de explorar as características dos CNT, os primeiros estudos foram realizados utilizando os CNT como fase estacionária na tradicional extração em fase sólida, empacotados em cartucho de extração em fase sólida. A extração foi realizada em um sistema de extração a vácuo, com auxílio de um Manifold®.

Este teste visava conhecer as propriedades desse material, como resistência ao fluxo, capacidade de adsorver os fungicidas triazólicos e seu comportamento frente a diferentes solventes, aquoso e orgânicos. Com esta finalidade, diferentes valores de massa de CNT (20 a 50 mg) foram aprisionados em um cartucho de extração em fase sólida e submetido ao seguinte procedimento de extração:



- a) Condicionamento: 5,0 mL de água ultrapura;
- b) Carregamento: 5,0 mL de solução aquosa contendo os quatro analitos, todos na concentração de  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;
- c) Eluição: 1,0 mL de solvente orgânico.

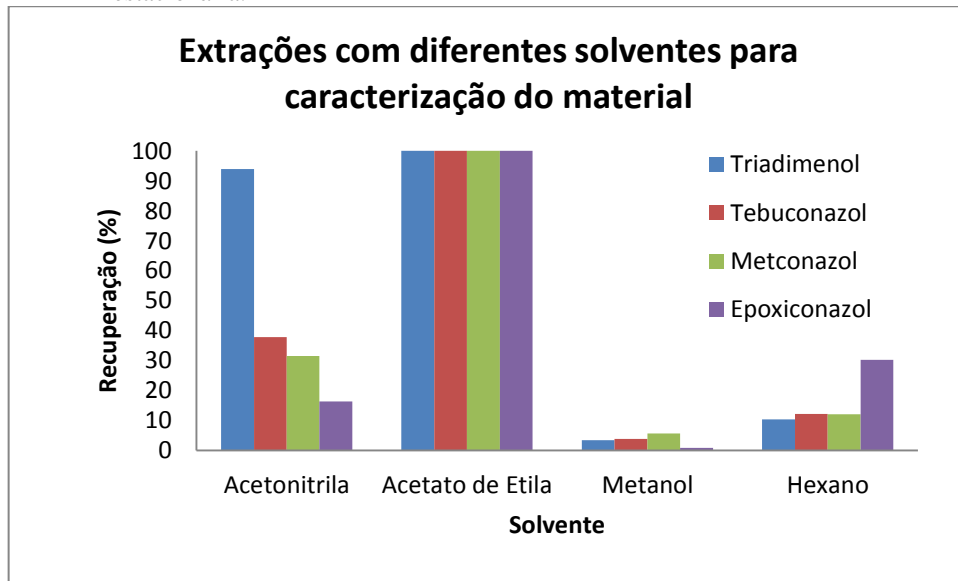
As extrações foram realizadas em quintuplicata e foram avaliados diferentes solventes para a eluição, como metanol, acetonitrila, acetato de etila e hexano. Os resíduos de condicionamento e carregamento foram descartados, enquanto o solvente de eluição foi recolhido separadamente e injetado diretamente no sistema cromatográfico.

Este estudo demonstrou que os CNT não sofreram modificações físicas visíveis quando expostos aos solventes orgânicos ou água, mas demonstrou que, devido a sua pequena dimensão estrutural, sofrem forte compactação e oferecem grande resistência ao fluxo, o que indicou a necessidade de trabalhar com baixos valores de massa de CNT. Caso haja interesse em utilizar uma massa de CNT acima da ordem de 20 mg, esta não pode ser diretamente compactada em um cartucho ou coluna de extração de pequeno diâmetro, sendo necessário desagrega-la com algum material inerte, como por exemplo lã de vidro, de modo a evitar a compactação e consequente resistência ao fluxo.

Observa-se que a necessidade de desagrega-los pode resultar em diminuição da capacidade sortiva, uma vez que, segundo a literatura, a interação entre os CNT e analitos pode ocorrer fora do interior e da camada externa dos nanotubos, nas ranhuras e canais intersticiais formados pela agregação de diferentes CNT, os quais ficam comprometidos quando ocorre espaçamento entre do CNT pela adição de material inerte.

A principal característica observada neste estudo foi a elevada capacidade sortiva dos CNT, uma vez que a passagem de pequeno volume de amostra resultou em elevados valores de área. Os resultados obtidos foram utilizados apenas para conhecimento das características dos CNT, mas, dentre os solventes avaliados, o acetato de etila foi o que demonstrou maior capacidade de eluir os analitos retidos no CNT, conforme pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 - Extrações de amostra de fungicidas triazólicos por SPE com CNT como fase estacionária.



Fonte: Do autor.

Nota: Avaliação do comportamento dos CNT frente a diferentes solventes aquoso e orgânicos e avaliação da capacidade de eluição dos solventes orgânicos. O resultado é expresso em recuperação, tomando o solvente acetato de etila como 100 % devido a sua maior recuperação.

### 5.3 DISCO IMPREGNADO POR NANOTUBOS DE CARBONO

Tendo em vista a alta capacidade sortiva do CNT, foi observado que o preparo de amostras por extração em fase sólida em disco seria a melhor alternativa para atingir baixos limites de quantificação, uma vez que este procedimento possibilita o emprego de um grande volume de amostra e, por apresentar a fase extratora como um filme delgado uniformemente distribuído sobre sua superfície, contorna sua propriedade de alta compactação, evitando a necessidade de elevadas pressões durante a passagem da amostra.

A literatura relata o preparo de discos impregnados com nanotubos de carbono, chamado de *buckypaper*, mas não com a finalidade de preparo de amostras. Entre exemplos de aplicação desse tipo de material, pode-se destacar membranas eletromagnéticas para uso como sensor, membranas de filtração para limpeza de materiais por sequestro de sujeiras/contaminantes pelo CNT, materiais com a propriedade de conduzir carga elétrica para o emprego desde em eletrônicos domésticos (como televisores e monitores) até condução de impulsos nervosos em células animais, materiais condutores de calor para possibilitar o resfriamento de equipamentos eletrônicos, revestimento de materiais contra incêndio – devido

a sua resistência ao fogo, suportes de catálise e outras aplicações. (LOH, 2013; DHARAP, 2004; REIN, 2011)

As principais metodologias de síntese de *buckypaper* são a filtração positiva ou negativa de uma solução contendo os CNT dispersos em surfactante, o qual aumenta sua dispersibilidade em solução aquosa. As Figuras 6 e 7 são exemplos de síntese desse material, por filtração negativa e positiva, respectivamente.

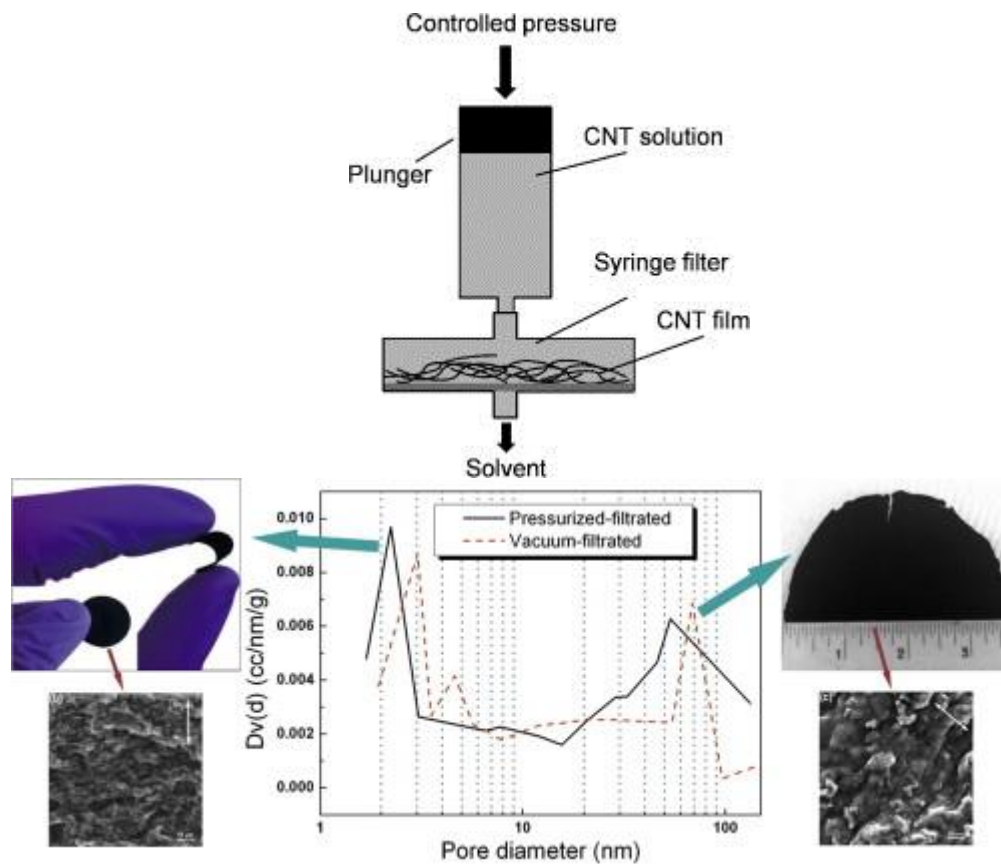
Figura 6 - Preparo de buckypaper por filtração da mistura CNT e solução dispersante previamente tratada com agitação e ultrassom.



Nota: A massa de 120 mg de CNT foi filtrada com dois litros de surfactante para uma membrana de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro de 78 mm de diâmetro.

Fonte: Composites Science and Technology, 13 (2013) 1–9.

Figura 7 - Preparo de buckypaper por filtração positiva.



Nota: Aplicação de pressão acima da solução a ser filtrada com auxílio de uma seringa. Neste trabalho uma solução de 500 mg de CNT dispersa em um litro de surfactante foi filtrada em uma membrana de acetato de celulose com a,45  $\mu\text{m}$  de poro de 33 mm de diâmetro.

Fonte: Microporous and Mesoporous Materials, 184 (2014) 127–133.

As primeiras metodologias de impregnação dos CNT em discos foram realizadas em membranas de nylon (membrana usada para filtrar solventes orgânicos) com tamanho de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ , conforme descrito na literatura para o preparo de *buckypaper*. Para isso, foi utilizado um sistema de filtração a vácuo e membranas de nylon da Millipore.

Três metodologias de impregnação foram avaliadas, todas partindo da massa de 30 mg de CNT. Na primeira metodologia avaliada (HWANG, 2013), adicionou-se a massa de CNT em uma solução de Triton-X 0,05% preparada em metanol - essa solução com surfactante tem a finalidade de dispersar os CNT no solvente. Em seguida, a mistura foi submetida ao ultrassom por 30 min e filtração a vácuo. Após a filtração a vácuo, o disco é lavado com metanol e acetona, para remoção do excesso de surfactante e seco em estufa a 60°C por 2 horas.

Na segunda metodologia (LOH,2013), a massa de CNT é dispersa no solvente dimetilformamida – solvente com a propriedade de dispersar os CNT - e esta solução

submetida à agitação em chapa de agitação por 30 min, seguido da filtração a vácuo. Após a filtração, o disco é lavado com água ultrapura e seca em estufa a 60°C por 2 horas.

Por fim, na terceira metodologia, a massa de CNT é apenas dispersa em água ultrapura e submetida à filtração a vácuo. Depois o disco é seco em estufa a 60°C por 2 horas. Esta terceira metodologia foi realizada para servir como controle, de comparação com as outras, e avaliar o efeito de cada solvente.

Após testes em bancada e avaliação de variações nas metodologias, apenas a primeira e a segunda metodologia produziram discos impregnados. Entretanto, possivelmente devido ao pequeno tamanho de poro da membrana e elevada massa de CNT o filme de fase estacionária ficou fracamente ligado aos discos, de modo que eles se soltam facilmente após a adição da amostra no sistema de filtração. Outro fator que contribui para a baixa adesão do CNT é a necessidade de aplicar uma pressão negativa muito elevada, para exercer a força necessária para deslocar os CNT para o interior dos poros da membrana, característica que não foi atingida com o modelo de bomba de vácuo disponível.

A Figura 8 é uma foto do resultado obtido com a metodologia 1 e mostra a membrana impregnada sobre um suporte PTFE usado na extração em fase sólida em disco.

Figura 8 - Foto do disco obtido com as condições de síntese, na metodologia.



Fonte: Do autor.

Logo, surgiu a necessidade de avaliar outro suporte para a impregnação das membranas, o qual foi obtido com o papel filtro composto por celulose. Após alguns testes em laboratório, observou-se a propriedade do ácido nítrico em decompor este papel e, se sua ação sobre o papel ocorrer por breve intervalo de tempo, há a possibilidade de aumentar os poros já existentes ou criar novos poros, sem decompor totalmente o papel. Assim, após diversas tentativas e baseando-se nos procedimentos de síntese de *buckypaper* descritos na literatura, (HWANG , 2013; REIN, 2011) obteve-se um procedimento ideal para a impregnação de CNT em membrana de celulose, descrito no item 4.4 “Impregnação dos Nanotubos de Carbono em Membrana de Celulose”.

Após as etapas, obtêm-se um disco de papel filtro com uma delgada camada de nanotubos de carbono uniformemente distribuídos sobre o papel e fixados no seu interior, de modo que não são removidos nem com a passagem da amostra nem com ação mecânica (agitação do papel). O disco sintetizado e o sistema de extração em disco são ilustrados na Figura 10.

As variáveis estudadas e os resultados observados foram:

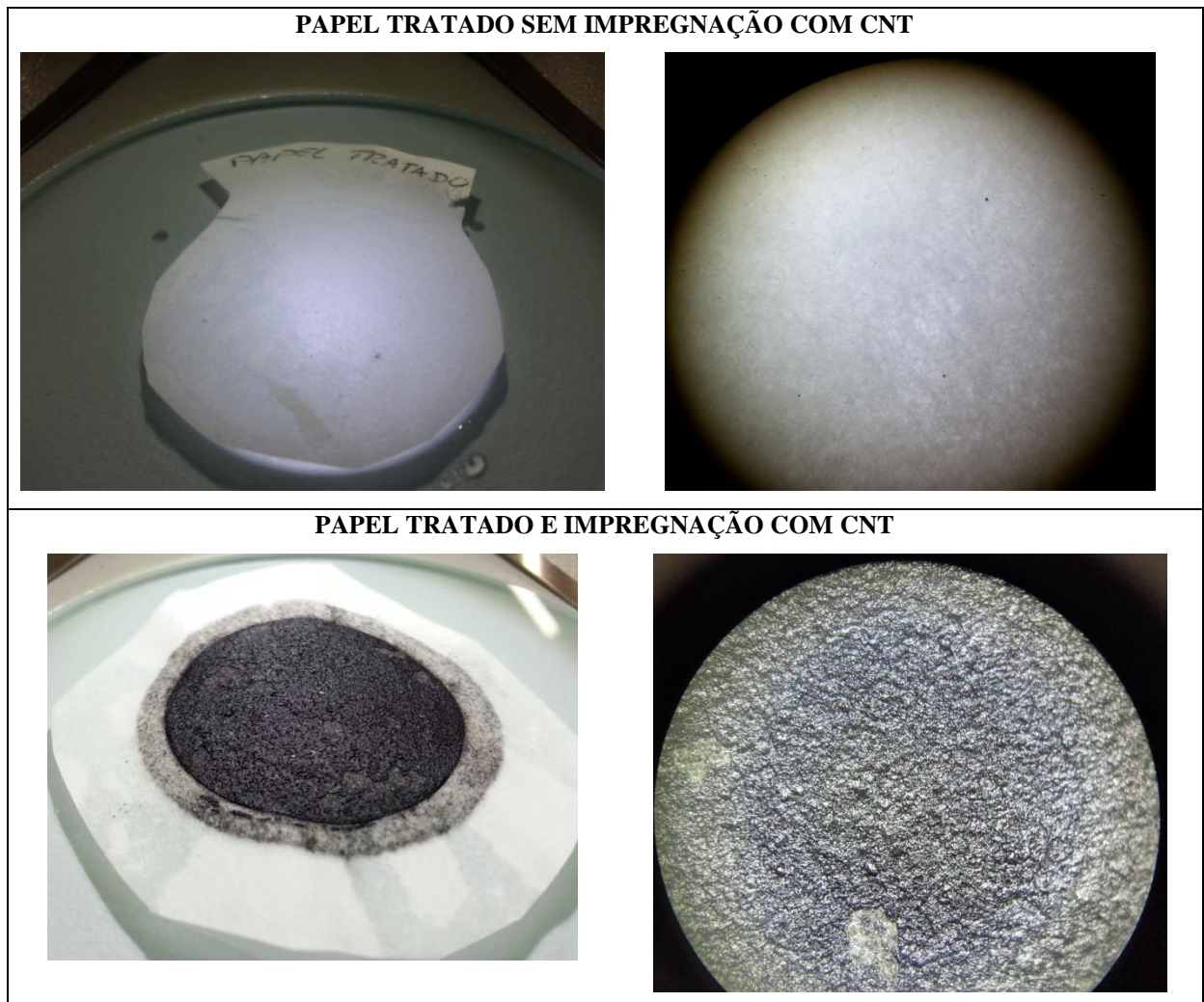
- a) Volume de ácido nítrico: foram avaliados os volumes de 5, 10 e 20 mL e observou-se que o volume deveria ser o necessário para cobrir todo o papel filtro, não havendo influência volumes superiores a este;
- b) Temperatura do ácido nítrico: foram avaliados a ausência de aquecimento e o aquecimento a 70 °C. Observou-se que quando o papel de celulose não era tratado com aquecimento, não havia a formação dos poros para impregnação dos CNT, resultando em um disco em que o CNT não era uniformemente distribuído;
- c) Tempo de reação do ácido nítrico com o papel filtro: foram avaliados os tempos de 0, 2, 4 e 6 min. Quando não havia a reação do ácido nítrico com o papel de celulose, não ocorria a formação/aumento dos poros e conseqüentemente, os CNT não sofriam fixação no papel filtro. Intervalos de tempo superiores a 2 min promoviam a degradação do papel sendo, então, 2 min o tempo ideal para a formação/aumento dos poros;
- d) Volume de Triton-X 100: Foi avaliado qual o volume mínimo para promover uma completa dispersão dos CNT, o qual foi atingido com o valor de 50 mL de Triton-X 100 a 0,1%;
- e) Sistema de filtração: Dentre os sistemas de filtração avaliados, apenas o sistema de filtração de fase móvel para HPLC promoveu a homogênea distribuição dos CNT devido a sua composição por vidro sinterizado na região de suporte de

membrana, capaz de oferecer uma pressão homogênea para toda a região da membrana;

- f) Massa de Nanotubos de Carbono: avaliou-se as massas de 10, 15, 20 e 25 mg, sendo que massas acima de 15 mg não ficam fortemente aderidas ao papel filtro porque 15 mg foi o suficiente para saturar os poros presentes no papel.

Para demonstrar o efeito promovido pelo processo de impregnação de CNT desenvolvido, um disco tratado pelo procedimento de impregnação, exceto pela adição de CNT, e outro submetido a todo o processo de impregnação foram submetidas a lupa de aumento, conforme demonstrado na Figura 9.

Figura 9 - Fotos de discos submetidos ao processo de impregnação



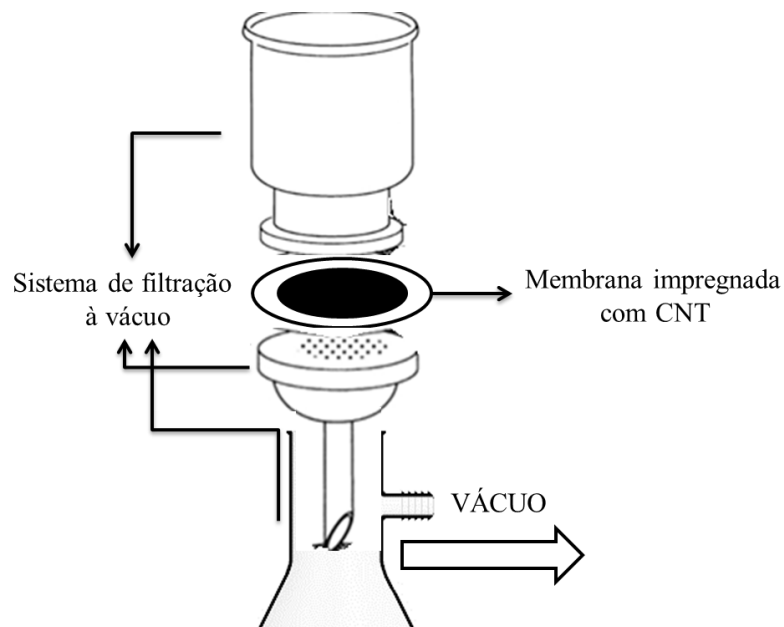
Nota: Acima: sem a adição de CNT; abaixo: com adição de CNT. As imagens da esquerda representam uma foto do tamanho real do disco, sem aumento, enquanto as imagens da direita foram obtidas com aumento proporcionado por uma lupa.

Fonte: Do autor.

Assim, o procedimento inicial de extração em disco (Figura 10) foi padronizado como:

- a) Condicionamento: 100,0 mL de água ultrapura;
- b) Carregamento: 100,0 mL de solução aquosa contendo os quatro analitos, todos na concentração de  $100 \text{ ng.mL}^{-1}$ ;
- c) Eluição: 5,0 mL de acetato de etila;
- d) O eluato é seco e ressuspendido em 250  $\mu\text{L}$  do solvente de eluição.

Figura 10 - Esquema ilustrativo do processo de extração em disco com disco impregnado com CNT.



Fonte: Do autor.

#### 5.4 ESTUDO DO pH DA AMOSTRA

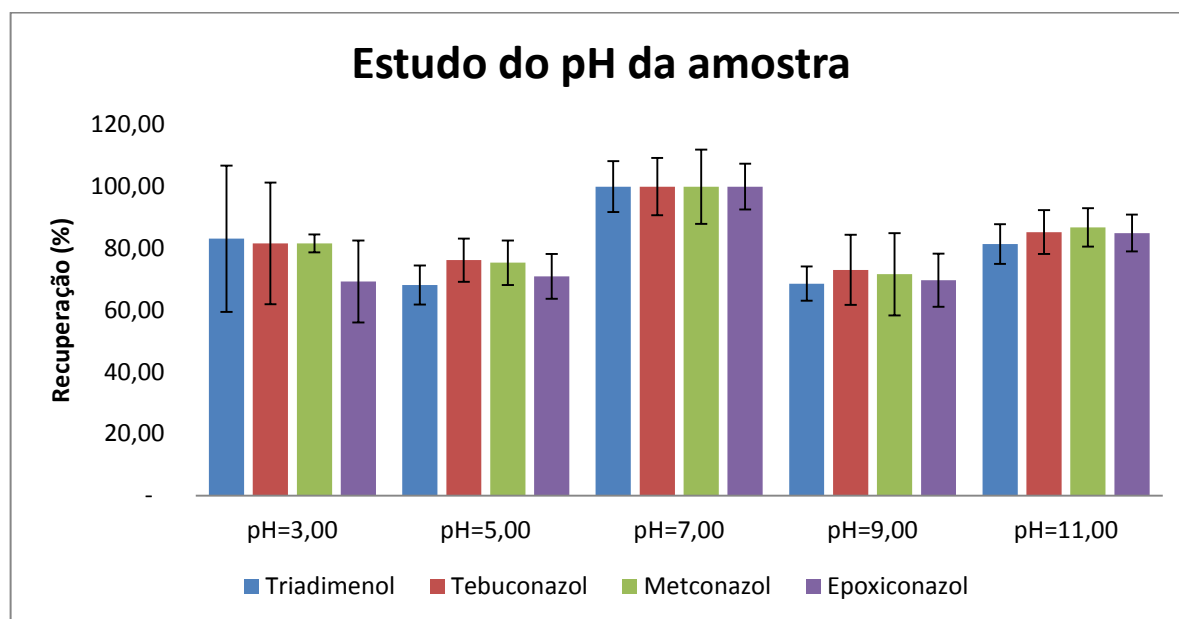
Definida a metodologia de extração, todas as etapas do procedimento de extração foram otimizadas no modo univariado, ou seja, avaliando-se uma variável por vez, tomando por base o procedimento de extração acima descrito.

A primeira variável analisada foi a influência do pH da amostra frente a capacidade sortiva dos CNT. As amostras tiveram seu valor de pH ajustado para 3,00, 5,00, 7,00, 9,00 e



11,00, através da alcalinização com hidróxido de sódio ou acidificação com ácido clorídrico. Para cada valor de pH, a extração foi realizada em triplicata, e os resultados comprovaram que os maiores sinais e menores valores de desvio padrão relativo foram obtidos com o valor de pH igual a 7,00, conforme ilustrado na Figura 11.

Figura 11 - Estudo do pH da amostra.



Nota: N=3. Resultado expresso em recuperação, tomando o pH 7, o qual apresenta maior intensidade de sinal, como 100%.

A literatura não reporta os valores pKa para os 4 analitos em estudo. Eva Čadková et al realizaram a determinação do pKa do tebuconazol em 2013, com valor de pKa igual a 5,0 – sendo este o único valor de pKa disponível para os 4 analitos. (ČADKOVÁ, 2013).

Como os analitos em estudo são moléculas ácidas e, tomando por base o pKa do tebuconazol, supõe-se que no valor de pH em que foram obtidos os maiores sinais, pH=7,00, as moléculas estarão na sua forma ionizada e, portanto, a interação entre os analitos e o CNT se dá pela interação dos anéis aromáticos dos analitos com a estrutura hexagonal composta por átomos de carbono e as interações não covalentes, como interação  $\pi$ - $\pi$  e van der Waals. (RAVELO-PÉREZ, 2010)

## 5.5 ESTUDO DO SOLVENTE DE ELUIÇÃO

Nesta etapa, foram realizadas diversas extrações alterando-se o solvente de eluição com o intuito de avaliar qual o solvente orgânico apresenta maior capacidade de retirar os analitos adsorvidos nos CNT.

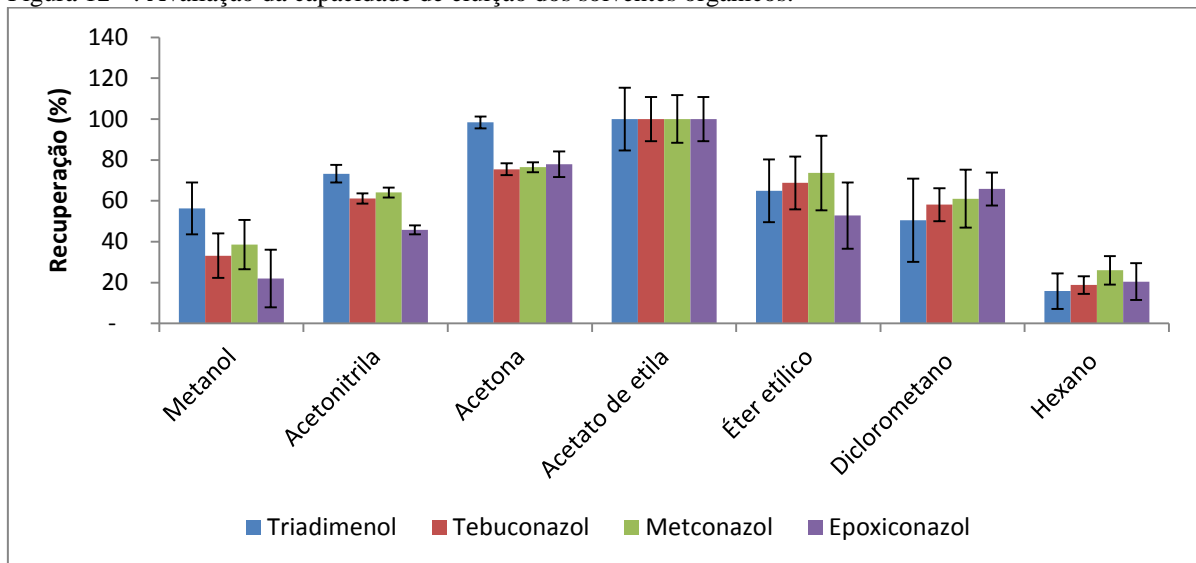
O protocolo de extração foi alterado, diminuindo-se a concentração da amostra de  $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para  $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  devido aos altos valores de sinal que eram obtidos, em virtude da elevada capacidade adsorptiva dos CNT, sendo cada solvente avaliado em triplicata.

Outro ponto alterado é decorrente do estudo de diferentes solventes orgânicos avaliados no processo de eluição. Como até então o eluato era diretamente injetado no sistema cromatográfico, nesta etapa foi necessário secar o eluato e ressuspender em um único solvente orgânico. Assim o eluato foi seco e ressuspendido em  $250 \mu\text{L}$  de acetato de etila, para posterior injeção no sistema cromatográfico.

Os solventes estudados foram selecionados para contemplar diferentes valores de polaridade - de hexano, com força eluotrópica igual a zero, a acetonitrila, com força eluotrópica igual a 0,50, ambos os extremos da relação força eluotrópica. Assim, os solventes estudados foram: acetato de etila, acetona, acetonitrila, diclorometano, éter etílico, metanol e hexano.

Conforme demonstrado na Figura 12, os solventes que apresentaram maior capacidade de eluir os analitos adsorvidos nos CNT foram o acetato de etila e acetona. Enquanto o primeiro apresentou uma maior capacidade de eluição, o segundo apresentou menores valores de desvio padrão relativo entre todos os solventes testados.

Figura 12 - : Avaliação da capacidade de eluição dos solventes orgânicos.



Nota: N=3. Resultado expresso em recuperação, tomando-se o solvente com maior recuperação (acetato de etila) como 100%.

Fonte: Do autor.

Frente às vantagens individuais do acetato de etila e acetona, o próximo estudo foi avaliar uma mistura desses solventes como solvente de eluição. Para isso, foram estudadas, aplicando o mesmo protocolo de extração, as misturas de solvente: acetato de etila:acetona nas proporções 1:3, 1:1 e 3:1.

A mistura na proporção 1:1 foi a que apresentou maiores valores de área para cada analito e menores valores de desvio padrão relativo, de 0,82 a 3,90% frente a valores de 6,62 a 18,21% para a proporção 3:1 e 16,63 a 20,47% para a proporção 1:3. Portanto, o solvente acetona:acetato de etila (1:1, v/v) foi definido como o solvente de eluição.

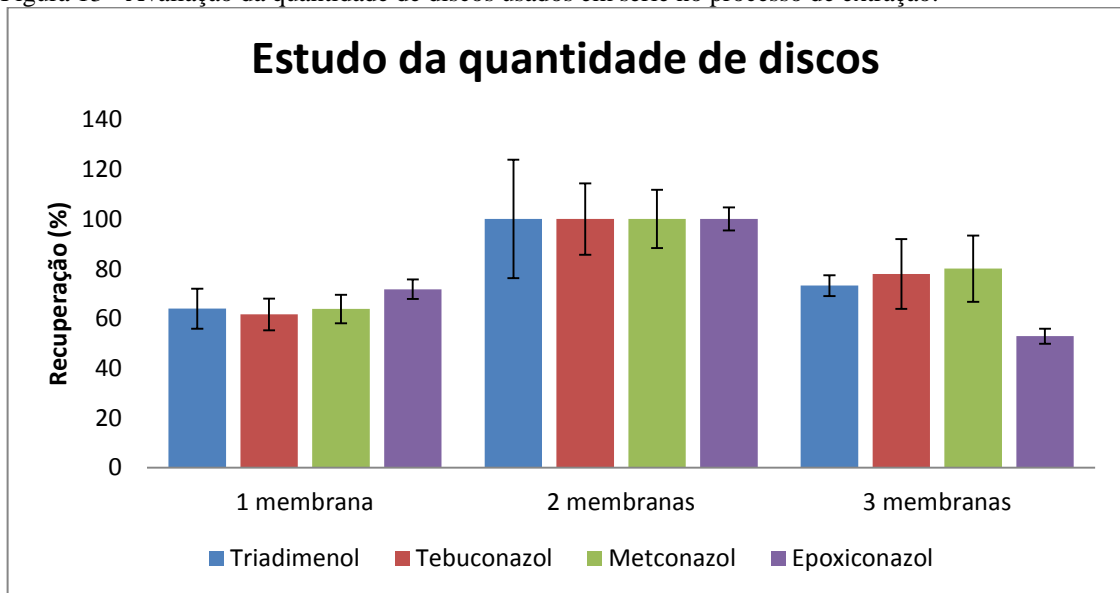
## 5.6 ESTUDO DA QUANTIDADE DE DISCOS

O sistema de extração apresentou ótimos resultados quanto à reprodutibilidade e a eficiência de extração. Contudo, foi possível impregnar no máximo 15 mg de CNT por papel, o que tornou o sistema limitado em termos de adsorção quanto a massa de fase estacionária. A fim de se utilizar uma maior massa para obter maior capacidade de concentração, foram avaliadas as quantidades de discos que poderiam ser usadas em série no processo de extração.

Os discos foram colocados um sobre o outro no sistema de filtração, com a superfície contendo os CNT voltados para cima. Avaliou-se de 1 a 3 discos e o resultado é apresentado na Figura 13 através do gráfico de barras.

O sistema de extração empregando dois discos foi o que apresentou maior recuperação, o que pode ser observado pela maior intensidade dos sinais para todos os analitos. Entretanto, foi também o sistema que apresentou maior desvio padrão relativo e, mesmo sendo esta uma desvantagem significativa, o procedimento de extração com dois discos foi mantido pois, acreditou-se que ao se otimizar todas as variáveis e iniciar o de padrão interno, esta desvantagem seria contornada.

Figura 13 - Avaliação da quantidade de discos usados em série no processo de extração.



Nota: Finalidade: obter maior recuperação. N=3. Resultado expresso em recuperação, tomando-se como base 2 membranas para 100%.

Fonte: Do autor.

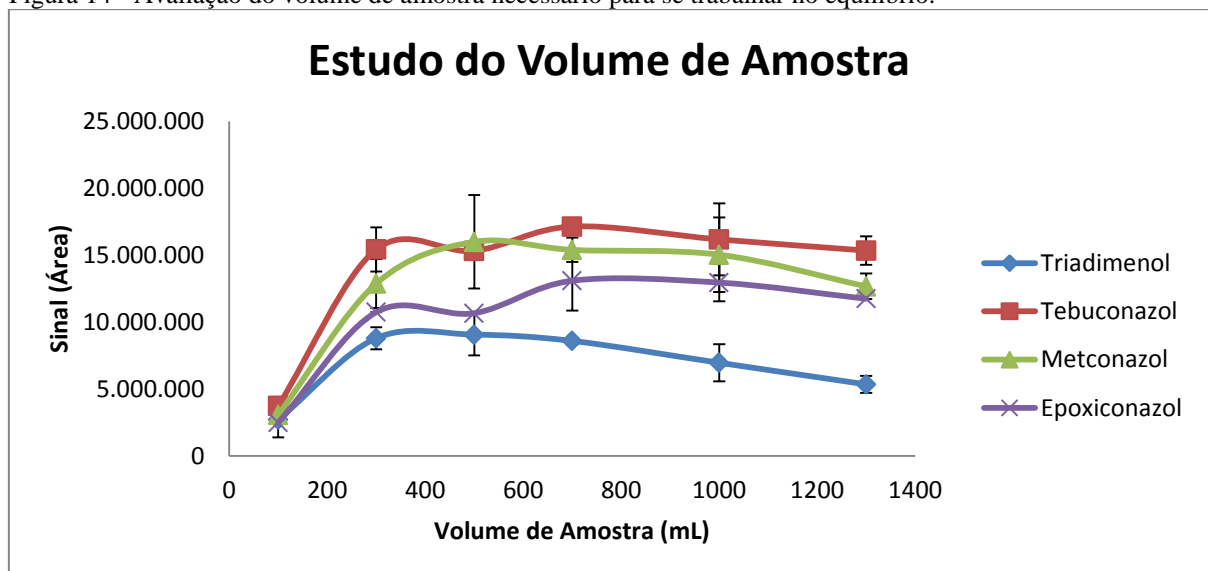
## 5.7 ESTUDO DO VOLUME DE AMOSTRA

Este parâmetro foi avaliado conforme o procedimento de extração descrito acima, variando o volume de amostra, e com o uso de dois discos de extração no aparato de extração. Durante a realização deste estudo, observou-se a necessidade de adicionar um papel filtro, não impregnado, sobre o primeiro disco, para evitar que o impacto promovido pelo elevado volume de amostra adicionado sobre o sistema de filtração deslocasse os CNT impregnados.

Destaca-se que o filme formado no procedimento de impregnação é firmemente aderido ao papel, não se desloca com facilidade. Entretanto, o procedimento de verter altos volumes de amostra sobre o disco, várias vezes em sequência, cria uma força capaz de, ao longo de várias extrações, desprender uma pequena massa do CNT impregnado, a qual é deslocada e visualizada como um precipitado na amostra. Assim, a proteção do disco de extração com um papel filtro impede a retirada de CNT da membrana, permanecendo todo o CNT sempre aderido aos discos de extração.

O volume de amostra foi estudado em 100, 300, 500, 700, 1000 e 1300 mL utilizando como amostra uma solução aquosa contendo os 4 analitos na concentração de 100 ng.mL<sup>-1</sup>. O resultado é expresso através de um gráfico de dispersão, na Figura 14.

Figura 14 - Avaliação do volume de amostra necessário para se trabalhar no equilíbrio.



Nota: N=3.

Fonte: Do autor.

O sinal cresce proporcionalmente ao volume de amostra de 100 a 400 mL e, a partir deste valor apresenta-se constante até aproximadamente o volume de 1000 mL, com decréscimo significativo em seguida – exceto para o triadimenol, no qual a partir de 700 mL já há um decréscimo significativo do sinal. Esse resultado, provavelmente, se deve a saturação do material adsorvente a partir de 400 mL, o que torna o sinal constante – ou seja, a partir de 400 mL de amostra todos os sítios de interação disponíveis nos CNT estão ocupados. Já a partir do volume de 1000 mL, o sinal decresce, provavelmente, devido ao alto volume de

amostra, o qual passa a apresentar a propriedade de eluir os compostos retidos. Frente aos resultados, o volume de amostra foi fixado em 400 mL, valor no qual foi estabelecido o equilíbrio.

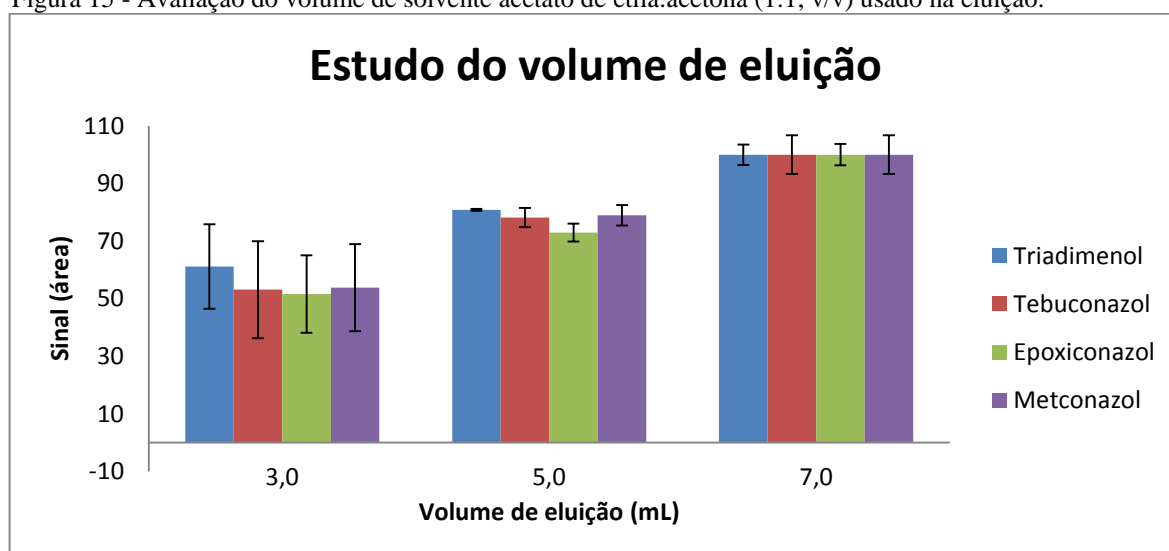
## 5.8 ESTUDO DO VOLUME DE SOLVENTE DE ELUIÇÃO

O volume do solvente de eluição foi otimizado para promover uma completa eluição dos analitos de interesse, aumentando assim o sinal e a repetibilidade e, ainda, para evitar efeito de memória (quando todos os analitos de interesse não são eluídos e, conseqüentemente, são detectados em uma análise subsequente). Para isso, o volume acetato de etila:acetona (1:1, v/v) foi avaliado em 3,0, 5,0 e 7,0 mL.

Como pode ser observado na Figura 15, o volume de 7,0 mL foi o que resultou em maior valor de área e desvio padrão semelhantes ao apresentado pelo volume de 5,0 mL. Logo, com a finalidade de se obter um maior sinal, o volume de 7,0 mL foi padronizado no procedimento de extração.

Volumes de solvente de eluição superiores a 7,0 mL não foram analisados a fim de se evitar o gasto excessivo de solventes.

Figura 15 - Avaliação do volume de solvente acetato de etila:acetona (1:1, v/v) usado na eluição.



Nota: N=3. Resultado expresso em recuperação, sendo a eluição com 7,0 mL de solvente (maior intensidade de sinal) tomada como 100%.

Fonte: Do autor.

## 5.9 ESTUDO DA NATUREZA E VOLUME DO SOLVENTE DE RESSUPENSÃO

O solvente usado para ressuspender a amostra após secagem do eluato foi, primeiramente, estudado quanto a sua natureza. Para isso, foi preparado uma solução padrão dos triazóis a  $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em acetato de etila:acetona (1:1, v/v) e 7,0 mL desta solução transferidos para um tubo de ensaio, o qual foi submetido a etapa de secagem. O teste foi realizado sem e com aquecimento a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  e sempre em triplicata. Em seguida, os padrões foram ressuspensos nos solventes orgânicos listados a seguir, nos quais os triazóis são mais solúveis: metanol, acetona, acetato de etila e acetonitrila.

O resultado demonstrou que o aquecimento até  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  não influencia no sinal (não provoca degradação da amostra) e que o melhor solvente para ressuspender a amostra é a acetona, a qual apresenta menor desvio padrão relativo de 0,9 a 2,7%.

Por fim, o solvente de ressuspensão foi estudado quanto ao seu volume, em 150 e 300  $\mu\text{L}$ . Não foram estudados volumes menores porque acredita que estes seriam insuficientes frente ao volume de solvente de eluição que é submetido à secagem e volumes maiores não foram estudados para evitar a diluição da amostra. Observou-se que o volume de 150  $\mu\text{L}$  apresentou maiores valores de área com menores valores de desvio padrão relativo e, portanto, foi adotado este volume para ressuspensão. Dessa maneira, o protocolo de extração otimizado foi:

- a) Condicionamento: 100,0 mL de água ultrapura;
- b) Carregamento: 400,0 mL de amostra;
- c) Eluição: 7,0 mL de acetato de etila:acetona (1:1, v/v);
- d) Secagem do eluato em concentrador de amostras a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ;
- e) Ressuspensão em 150  $\mu\text{L}$  de acetona;
- f) Injeção de 3,0  $\mu\text{L}$  no sistema cromatográfico.

## 5.10 MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DOS NANOTUBOS DE CARBONO

O último parâmetro avaliado para otimizar o processo de extração foi a necessidade de modificações nos nanotubos de carbono com o intuito de aumentar sua capacidade adsorptiva. A literatura descreve dois processos: a oxidação dos CNT e a eliminação dos

solventes e resíduos de sua síntese. Para esta avaliação foram preparadas três discos de extração. A primeira sem alterações nos CNT, a segunda com a eliminação dos resíduos provenientes da síntese dos CNT e a terceira trabalhando com CNT oxidados.

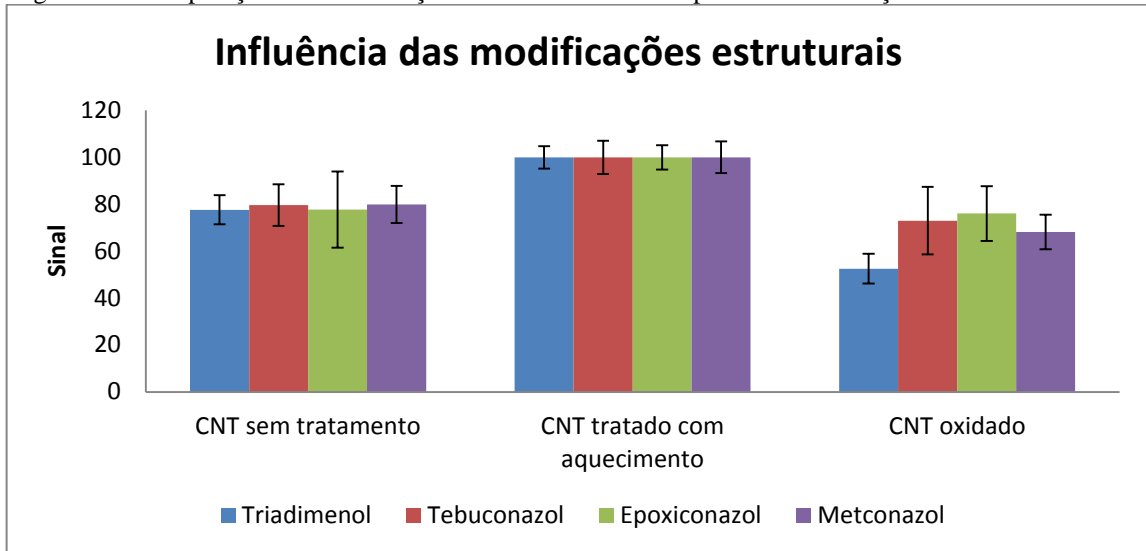
O tratamento com aquecimento decompõe os grupos funcionais dos reagentes de síntese que bloqueiam a entrada dos poros dos CNT, uma vez que estas substâncias são termolábeis e, com isso, há um aumento da área superficial externa. Já o tratamento com ácido leva a formação de grupos hidroxilas ou carboxilas nos CNT e aumento da área superficial, aumentando assim sua capacidade de retenção. (SITKO; ZAWISZA; MALICKA, 2012)

O tratamento térmico foi realizado com o aquecimento do CNT em estufa a 80 °C por 2 horas. (REN, 2011; RAVELO-PÉREZ, 2010) O processo de oxidação foi realizado adicionando-se 100 mg de CNT em 30 mL de ácido nítrico e este aquecido a 120 °C por 2 horas, sobre refluxo. Após o aquecimento em ácido, o material foi filtrado, lavado com água ultrapura e aquecido a 80 °C por 2 horas para evaporar os solventes utilizados. (TARLEY et al, 2006)

Os três discos sintetizados com os diferentes CNT foram avaliadas submetendo-as ao processo de extração otimizado, com a amostra na concentração de 100 ng.mL<sup>-1</sup>. Como resultado observou-se um aumento médio de 27 % do sinal quando utilizada disco com CNT submetido ao aquecimento e uma diminuição média 15 % do sinal quando utilizada o disco com CNT oxidado, conforme Figura 16.



Figura 16 - Comparação das modificações estruturais sobre a capacidade de extração dos CNT.



Nota: N=3. Resultado expresso em recuperação, tomando-se como 100% a extração realizada com CNT tratado com aquecimento – teste de maior intensidade de sinal.

Fonte: Do autor.

## 5.11 VALIDAÇÃO

Para demonstrar que o procedimento analítico proposto é adequado aos seus objetivos, o método foi submetido a uma validação. Na ausência de um guia de validação nacional para determinação de praguicidas em amostras de água, dois guias internacionais foram tomados como referência: o “Guidance document on pesticide residue analytical methods” (SANCO/825/00 rev. 8.1) publicado em 2010 pela União Européia, e o “Regulatory Limits For Pesticide Residues In Water” publicado em 2003 pela IUPAC. Ambos os guias estabelecem as normativas e instruções para o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para quantificação de praguicidas em amostras de água.

Desse modo, o método analítico foi validado nos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limite de quantificação, exatidão, precisão, efeito matriz e recuperação.

Durante o desenvolvimento da metodologia foi observado que extrações em concentrações muito baixas (menor que  $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) apresentaram um desvio padrão relativo superior a 15 % e, por isso, optou-se em utilizar padrão interno (PI), com a finalidade de corrigir os erros ocorridos durante o processo de extração. Dentre os analitos avaliados no desenvolvimento, o metconazol foi escolhido como padrão interno por ser um praguicida não utilizado na região de Alfenas: ele está presente em apenas duas formulações comerciais, o

Caramba 90 e o Opera Ultra, ambos não empregados nessa região, segundo especialista da Cooxupé – Cooperativa dos Produtores de Café do Sul de Minas Gerais. Ademais, o metconazol satisfaz os requisitos de um padrão interno como: estrutura química semelhante aos analitos em estudos e isento na matriz em estudo.

Com isso, as respostas das análises na etapa de validação são sempre expressas em área relativa (área do analito/área do PI), exceto para o teste de seletividade.

Antes de iniciar a etapa de validação, várias amostras de água da represa de Furnas foram coletadas, sempre em pontos afastados de plantações e pontos de despejo de água contaminada/esgoto. Estas amostras foram homogeneizadas, 6 alíquotas retiradas e submetidas ao processo de extração – 3 alíquotas sem adição de PI e 3 alíquotas fortificadas com PI, para confirmar que a amostra utilizada na validação era isenta do PI e dos analitos de interesse.

Após esta confirmação várias alíquotas da amostra foram fortificadas pela adição de volumes específicos da solução padrão epoxiconazol + triadimenol + tebuconazol a  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  nas suas respectivas concentrações. As amostras foram fortificadas imediatamente antes de seu uso.

Após o preparo da amostra, várias alíquotas eram tomadas em proveta de 500 mL e a elas adicionado o volume de 500  $\mu\text{L}$  de PI.

#### 5.11.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada realizando-se o procedimento de extração a 6 diferentes amostras “branco” sem adição do PI, comparando os resultados de área obtido a uma extração do ponto inferior da curva de calibração (LIQ).

As amostras branco não apresentaram picos nos tempos de retenção dos analitos, demonstrando sua seletividade.

### 5.11.2 Linearidade

A linearidade foi estudada nos pontos 0,05, 0,10, 0,50, 1,00, 2,00, 5,00 e 10,00  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para o epoxiconazol e nos pontos 0,10, 0,50, 1,00, 2,00, 5,00 e 10,00  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para o tebuconazol e epoxiconazol. Foram avaliadas 6 curvas de calibração, construídas com 6 pontos de calibração cada.

Inicialmente as curvas de calibração foram calculadas através do modelo matemático mais simples, a regressão linear. Em seguida, estas curvas de calibração foram utilizadas para calcular a concentração das amostras controle de qualidade (CQs) para se avaliar a precisão e exatidão do método e, então, observou-se que o modelo matemático aplicado não gerou bons resultados, uma vez que os CQs de baixa e alta concentração apresentaram resultados de exatidão insatisfatórios – maior que  $\pm 15\%$ .

A provável razão da não adequação deste modelo matemático é a ampla faixa de concentração em análise, na ordem de 200 vezes, o que faz com que os calibradores tenham pesos diferentes.

Logo, a curva de calibração foi novamente calculada, a partir de um novo modelo matemático, o polinomial. As curvas obtidas com este modelo apresentaram-se satisfatórias, dentro dos parâmetros aceitáveis dos órgãos regulatórios (valores de  $R^2$  superiores a 0,98), e foi o modelo que apresentou melhores valores de exatidão, para todas as amostras controle.

A Tabela 2 apresenta os parâmetros obtidos para as curvas de calibração dos três analitos:

Tabela 2: Parâmetros obtidos para a curva de calibração calculada através de polinômio para os três analitos em estudo.

<b>Analito</b>	<b>Faixa analítica</b> <b>(<math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</b>	<b>Equação da Reta</b>	<b><math>R^2</math></b>
<b>Triadimenol</b>	0,10 a 10,00	$y = 4,77\text{E-}09x^2 + 4,25\text{E-}05x + 9,26\text{E-}03$	0,9999
<b>Tebuconazol</b>	0,10 a 10,00	$y = 1,353\text{E-}09x^2 + 1,873\text{E-}04x + 1,214\text{E-}02$	0,9998
<b>Epoxiconazol</b>	0,05 a 10,00	$y = -2\text{E-}08x^2 + 0,0003x + 0,0059$	0,9999

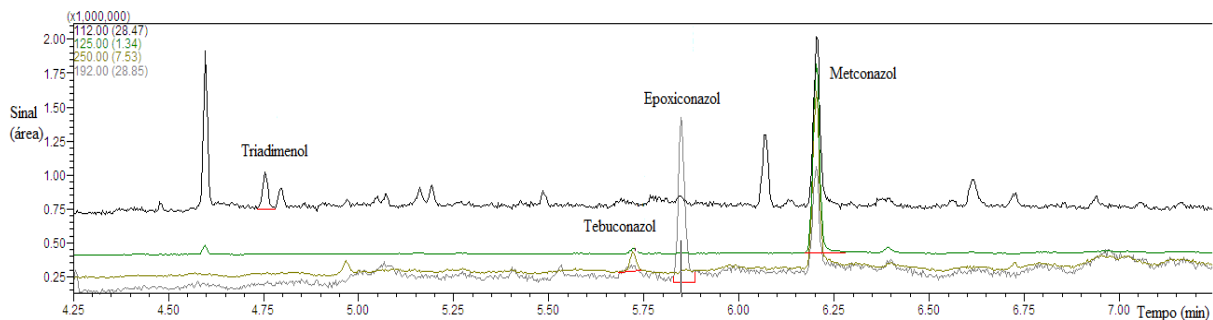
Fonte: Do autor.

### 5.11.3 Limite de quantificação

O limite inferior de quantificação (LIQ) foi definido como a menor concentração do analito preparado em matriz e quantificado com exatidão e precisão menor que 20%. Para isso foram preparadas amostras em concentrações decrescentes, as quais foram submetidas ao processo de extração e analisadas quanto a exatidão e precisão. Assim, o LIQ foi definido como a menor concentração que apresentou exatidão e precisão inferior a 20 %, conforme preconizado pelos órgãos regulatórios.

Com isso, o valor de LIQ obtido para o epoxiconazol foi igual a  $0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$  e os valores LIQ obtidos para o triadimenol e tebuconazol foram  $0,10 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Figura 17). Portanto, baseado nos limites expostos pela Comunidade Européia, que preconiza LMTs em águas a concentração de  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$  para cada praguicida e de  $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  para um total deles (DIRECTIVE 2006/118/EC), o método desenvolvido atingiu seu objetivo de poder inferir sobre a qualidade de águas de abastecimento para o consumo humano.

Figura 17 - Cromatograma obtido da análise de uma amostra fortificada na concentração do limite inferior de quantificação.



Fonte: Do autor.

Ainda, ao adotar a legislação brasileira como referência para o limite de exposição, através da portaria número 2.914 de 12 de dezembro de 2011, do Ministério da Saúde, que estabelece o limite específicos o tebuconazol  $180 \mu\text{g.L}^{-1}$  podemos observar que o método desenvolvido apresenta uma detectabilidade muito inferior ao mínimo necessário, resultado do seu alto poder de pré-concentração.

#### 5.11.4 Exatidão e precisão

A exatidão e a precisão do método foram avaliadas utilizando as amostras controle de qualidade nas concentrações de 0,30, 1,00 e 5,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Os resultados estão apresentados nas Tabelas 3, 4 e 5. A Figura 18 apresenta um cromatograma típico de uma amostra fortificada no nível do controle de qualidade alto.

Tabela 3: Resultados dos testes de exatidão e precisão para o triadimenol.

<b>Triadimenol</b>				
<b>Intra-dia (n=6)</b>	<b>CN<sup>a</sup></b>	<b>0,30</b>	<b>1,00</b>	<b>5,00</b>
	<b>CA<sup>b</sup></b>	0,32	1,14	5,03
	<b>DPR<sup>c</sup>/%</b>	9,3	4,5	2,8
	<b>E<sup>d</sup>/%</b>	6,78	14,58	0,62
<b>Inter-dia (n=6)</b>	<b>CN<sup>a</sup></b>	<b>0,10</b>	<b>1,00</b>	<b>5,00</b>
	<b>CA<sup>b</sup></b>	282,2	1145,6	4396,7
	<b>DPR<sup>c</sup>/%</b>	5,1	5,6	3,5
	<b>E<sup>d</sup>/%</b>	-5,93	14,5	-12,07

Fonte: Do autor.

Nota: <sup>a</sup> Concentração nominal ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ). <sup>b</sup> concentração analisada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ). <sup>c</sup> Desvio padrão relativo. <sup>d</sup> Erro relativo.

Tabela 4: Resultados dos testes de exatidão e precisão para o tebuconazol.

<b>Tebuconazol</b>				
<b>Intra-dia (n=6)</b>	<b>CN<sup>a</sup></b>	<b>0,30</b>	<b>1,00</b>	<b>5,00</b>
	<b>CA<sup>b</sup></b>	0,26	0,89	4,83
	<b>DPR<sup>c</sup>/%</b>	9,4	3,4	2,0
	<b>E<sup>d</sup>/%</b>	-10,89	-10,23	-3,36
<b>Inter-dia (n=6)</b>	<b>CN<sup>a</sup></b>	<b>0,30</b>	<b>1,00</b>	<b>5,00</b>
	<b>CA<sup>b</sup></b>	0,32	1,04	4,92
	<b>DPR<sup>c</sup>/%</b>	6,7	4,9	1,7
	<b>E<sup>d</sup>/%</b>	0,37	4,82	-1,44

Fonte: Do autor.

Nota: <sup>a</sup> Concentração nominal ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ). <sup>b</sup> concentração analisada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ). <sup>c</sup> Desvio padrão relativo. <sup>d</sup> Erro relativo.

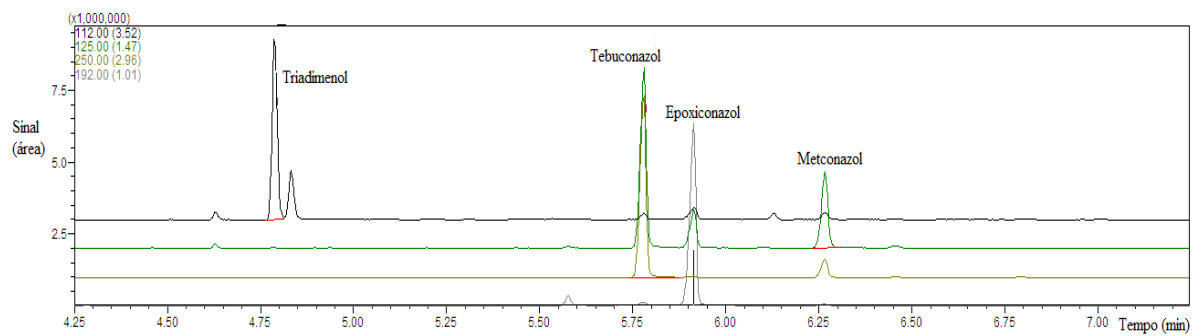
Tabela 5: Resultados dos testes de exatidão e precisão para o epoxiconazol.

Epoxiconazol				
<b>Intra-dia (n=6)</b>	<b>CN<sup>a</sup></b>	<b>0,30</b>	<b>1,00</b>	<b>5,00</b>
	<b>CA<sup>b</sup></b>	0,28	1,02	4,42
	<b>DPR<sup>c</sup>/%</b>	9,3	3,9	2,0
	<b>E<sup>d</sup>/%</b>	-4,40	2,85	11,60
<b>Inter-dia (n=6)</b>	<b>CN<sup>a</sup></b>	<b>0,30</b>	<b>1,00</b>	<b>5,00</b>
	<b>CA<sup>b</sup></b>	0,33	1,17	-4,61
	<b>DPR<sup>c</sup>/%</b>	11,4	9,9	2,1
	<b>E<sup>d</sup>/%</b>	0,38	17,74	7,72

Fonte: Do autor.

Nota: <sup>a</sup> Concentração nominal ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ). <sup>b</sup> concentração analisada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ). <sup>c</sup> Desvio padrão relativo. <sup>d</sup> Erro relativo.

Figura 18 - Cromatograma obtido da análise de uma amostra fortificada na concentração do controle de qualidade alto.



Fonte: Do autor.

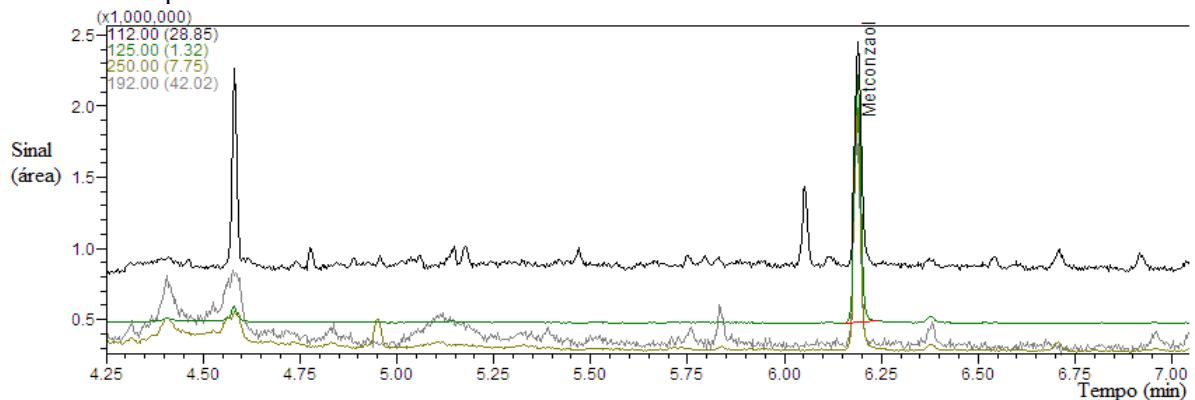
## 6 ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS

O método proposto foi aplicado para amostras reais para avaliar a contaminação da represa de Furnas por fungicidas triazólicos. Para isso, cinco amostras de água da represa de Furnas foram coletadas em pontos diferentes da região (três próximos ao município de Alfenas e dois próximos ao município de Campos Gerais – regiões com destacável produção agrícola de café).

As amostras foram submetidas ao processo de extração, em duplicata mais uma amostra sem adição de PI, logo após a coleta e submetidas a análise por GC-MS.

Não foi possível identificar nenhuma contaminação das amostras por estes 4 analitos. Tal fato pode apresentar duas justificativas. A primeira é realmente a ausência de contaminação, fato desejável. A segunda é a coleta das amostras em um período de estiagem, o que diminui o lixiviamento dos praguicidas para as águas. A Figura 19 apresenta um cromatograma típico obtido pela análise de uma amostra coletada da represa de Furnas adicionada do padrão interno.

Figura 19 - Cromatograma obtido da análise de uma amostra coletada da represa de Furnas adicionada do padrão interno.



Fonte: Do autor.

## 7 CONCLUSÕES

Este trabalho apresentou pela primeira vez o emprego de discos de extração impregnados com CNT para a finalidade de extração de toxicantes orgânicos em amostras ambientais. Além disso, apresentou uma nova metodologia de impregnação dos CNT, o que possibilita a utilização de discos para a etapa de preparo de amostras, propondo uma técnica inovadora e promissora para a etapa de preparo de amostras, em especial para determinação de resíduos em amostras de água.

O procedimento de extração desenvolvido se apresentou como uma metodologia rápida, prática e eficiente. O principal destaque são seus baixos valores de quantificação, o que permite inferir sobre a contaminação de fontes de água de abastecimento a baixas concentrações de contaminação – abaixo dos limites mínimos preconizados pela legislação brasileira e internacional.

O método desenvolvido foi preconizado, conforme requisitos de legislações internacionais e aplicado na análise de amostras de água da represa de Furnas, sem, entretanto, identificar a contaminação das amostras coletadas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia>>. Acesso em: 5 jan. 2015.

ALI, S.Y.; ASSADI, H.; WAW, I. Determination of Triazole Fungicides Using Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction Prior to Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, p. 3101-3107, 2012.

ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J. M. F. Comparison of the selectivity of different sorbent phases for bar adsorptive microextraction—Application to trace level analysis of fungicides in real matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1265, p. 7– 16, 2012.

ASENSIO-RAMOS, M. et al. Evaluation of multi-walled carbon nanotubes as solid-phase extraction adsorbents of pesticides from agricultural, ornamental and forestal soils. **Analytica Chimica Acta**, v. 647, p. 167–176, 2009.

BARAHONA, F. et al. Hollow fiber-liquid-phase microextraction of fungicides from orange juices. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 1989–1994, 2010.

ČADKOVÁ, E. et al. pK<sub>a</sub> Constant Determination of Two Triazole Pesticides: Tebuconazole and Penconazole. **Journal of Solution Chemistry**, v. 42, p. 1075-1082, 2013.

CARNEIRO, F. F. et al. **Dossiê ABRASCO –Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: Abrasco, p. 98, 2012.

CHEMSPIDER, Royal Society of Chemistry. Disponível em <<http://www.chemspider.com>>. Acesso em: 18 mar 2013.

COLLINS, C.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Unicamp, 2007.

DA COSTA J. L. Extração em fase sólida. In: MOREAU, R. L. M.; MOREAU, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Capítulo 16, p. 156 – 160.

Decreto Presidencial nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos.

DHARAP, P. et al. Nanotube film based on single-wall carbon nanotubes for strain sensing. **Nanotechnology**, v. 15, p. 379, 2004.

DIRECTIVE 2006/118/EC. The European Parliament And Of The Council.

DOS SANTOS NETO, A. J.; DE SIQUEIRA, M. E. P. B. Análise de praguicidas organofosforados em água por extração em fase sólida (SPE) utilizando discos C18 e cromatografia em fase gasosa: avaliação da contaminação do reservatório de Furnas (MG-Brasil). **Química Nova**, v. 28, p. 747-750, 2005.

DURAN, A.; TUZEN, M.; SOYLAK, M. Preconcentration of some trace elements via using multiwalled carbon nanotubes as solid phase extraction adsorbent. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, p. 466–471, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Embrapa. Cultivo do Café Robusta em Rondônia. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cafe/CultivodoCafeRobustaRO/doencas.htm>>. Acesso em: 15 abr 2013.

EUROPEAN COMMISSION, Directorate General Health and Consumer Protection. **Guidance document on pesticide residue analytical methods**. SANCO, rev. 8.1, 2010.

FANG, G. Z.; HE, J. X.; WANG, S. Multiwalled carbon nanotubes as sorbent for on-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of 10 sulfonamides in eggs and pork. **Journal of Chromatography A**, v. 1127, p. 12–17, 2006.

FONTANA, A. R. et al. Solid-phase extraction followed by liquid chromatography quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry for the selective determination of fungicides in wine samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 2165–2175, 2011.

FREITAS, L. A. de S. et al. Molecularly imprinted fibers with renewable surface for solid-phase microextraction of triazoles from grape juice samples followed by gas chromatography mass spectrometry analysis. **Analyst**, v. 139, p. 626-632, 2014.

GIAVINI, E.; MENEGOLA E. Are azole fungicides a teratogenic risk for human conceptus? **Toxicology Letters**, v. 198, p. 106–111, 2010.

GOETZ, A. K. et al. Disruption of Testosterone Homeostasis as a Mode of Action for the Reproductive Toxicity of Triazole Fungicides in the Male Rat. **Toxicological Sciences**, v. 95, p. 227–239, 2007.

HOU, X. et al. A multi-residue method for the determination of pesticides in tea using multi-walled carbon nanotubes as a dispersive solid phase extraction absorbent. **Food Chemistry**, v. 153, p. 121–129, 2014.

HWANG, S. et al. Electromechanical strain sensing using polycarbonate-impregnated carbon nanotube–graphene nanoplatelet hybrid composite sheets. **Composites Science and Technology**, v. 13, p. 1–9, 2013.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, Chemistry And The Environment Division Commission On Agrochemicals And The Environment. **Regulatory Limits For Pesticide Residues In Water** v. 75, p. 1123–1155, 2003.

KAHLE, M. et al. **Azole fungicides: occurrence and fate in wastewater and surface waters.** **Environmental Science Technology**, v. 42, p. 7193–7200, 2008.

KJAERSTA, M. B. et al. Do azole fungicides possess an endocrine disrupting hazard? **Toxicology Letters**, v. 180S, p. S32-S246, 2008.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em Fase Gasosa.** São Carlos: Acta, 1993.

LANÇAS, F. M. **Métodos Cromatográficos De Análise, Extração em Fase Sólida (SPE).** São Carlos: Rima, 2004.

LATORRE, C. H. et al. Carbon nanotubes as solid-phase extraction sorbents prior to atomic spectrometric determination of metal species: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 749, p. 16–35, 2012.

LI, Y. et al. Simultaneous enantioselective determination of triazole fungicides in soil and water by chiral liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1224, p. 51– 60, 2012.

LOH, S. H. et al. Multi-walled carbon nanotube-impregnated agarose film microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in green tea beverage. **Talanta**, v. 106, p. 200–205, 2013.

MANCLÚS, J. J. et al. Development of monoclonal immunoassays for the determination of triazole fungicides in fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8793-8801, 2008.

MENEZES FILHO, A. M.; SANTOS, F. N.; PEREIRA, P. A. P. Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas

chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC–MS) for the determination of pesticide residues in mangoes. **Talanta**, v. 81, p. 346–354, 2010.

NIU, H. et al. Evaluation of carbon nanotubes as a solid-phase extraction adsorbent for the extraction of cephalosporins antibiotics, sulfonamides and phenolic compounds from aqueous solution. **Analytica Chimica Acta**, v. 594, p. 81–92, 2007.

Pesticide Properties Database (PPDB), AGRICULTURE & ENVIRONMENT RESEARCH UNIT (AERU), University of Hertfordshire, 2008. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/index.htm>>. Acesso em: 15 abr 2013.

PINHEIRO, A.; SILVA M. R.; KRAISCH R. Presença de pesticidas em águas superficiais e subterrâneas na bacia do Itajaí, SC. **REGA** v. 7, p. 17-26, 2010.

PINTO, M. I. et al. Pesticides in water and the performance of the liquid-phase microextraction based techniques. A review. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 225–237, 2010.

PROGRAMA DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS. PARA. Portaria Nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Ministério da Saúde. Brasil. Disponível em

<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>>. Acesso em: 5 jan 2015.

PROGRAMA DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS. PARA. Relatório Complementar – 2012. GGTOX/ANVISA, Brasília, 14 de novembro de 2014.

PYRZYNSKA, K. Carbon nanotubes as sorbents in the analysis of pesticides. **Chemosphere**, v. 83, p. 1407–1413, 2011.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. Métodos De Extração e/ou Concentração De Compostos Encontrados Em Fluidos Biológicos Para Posterior Determinação Cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p. 68-76, 2001.

RAVELO-PÉREZ, L. M. et al. Carbon nanotubes: Solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2618–2641, 2010.

REIN, M. D.; BREUER, O.; WAGNER, H. D. Sensors and sensitivity: Carbon nanotube buckypaper films as strain sensing devices. **Composites Science and Technology**, v. 71, p. 373–381, 2011.

REN, X. et al. Carbon nanotubes as adsorbents in environmental pollution management: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 170, p. 395–410, 2011.

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

ROCKETT, J. C. et al. Effect of conazole fungicides on reproductive development in the female rat. **Reproductive Toxicology**, v. 22, p. 647–658, 2006.

SCOTT, R. P. W. **Chromatographic Science Series, Introduction to Analytical Gas Chromatography**. 2 ed. Nova Iorque: Marcel Dekker, 1998.

**Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários – AGROFIT**, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 29 jul 2014.

SITKO, R.; ZAWISZA, B.; MALICKA, E. Modification of carbon nanotubes for preconcentration, separation and determination of trace-metal ions. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 22-31, 2012.

TADEO, J. L. **Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples**, CRC Press, Boca Raton, 2008.

TARLEY, C. R. T. et al. Highly improved sensitivity of TS-FF-AAS for Cd(II) determination at ng L<sup>-1</sup> levels using a simple flow injection minicolumn preconcentration system with multiwall carbon nanotubes. **J. Anal. At. Spectrom**, v. 21, p. 1305–1313, 2006.

TOXNET – **TOXICOLOGY DATA NETWORK**. Disponível em <<http://toxnet.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 18 mar. 2013.

UPADHYAYULA, V. K. K. et al. Application of carbon nanotube technology for removal of contaminants in drinking water: A review. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 1–13, 2009.

WANG, C. et al. Application of dispersion–solidification liquid–liquid microextraction for the determination of triazole fungicides in environmental water samples by high-performance liquid chromatography. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, p. 71–76, 2011.

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

WU, Y. S.; LEE, H. K.; LI, S. F. Y. High-performance chiral separation of fourteen triazole fungicides by sulfated b-cyclodextrin-mediated capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 912, p. 171–179, 2001.

ZARN, J. A.; BRÜSCHWEILER, B. J.; SCHLATTER J. R. Azole Fungicides Affect Mammalian Steroidogenesis by Inhibiting Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase and Aromatase. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, p. 255-261, 2003.