

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E
ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
PROCESSOS E TECNOLOGIAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE PESTICIDAS EM VINHO BRANCO
POR MEMBRANAS DE MICROFILTRAÇÃO

Taís Caroline Turella

Caxias do Sul, 2020

Taís Caroline Turella

**AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE PESTICIDAS EM VINHO BRANCO
POR MEMBRANAS DE MICROFILTRAÇÃO**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de mestre em Engenharia de Processos, orientada pela Prof^ª. Dr^ª. Venina dos Santos.

Caxias do Sul, 2020.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

T934a Turella, Taís Caroline

Avaliação da remoção de pesticidas em vinho branco por membranas de microfiltração [recurso eletrônico] / Taís Caroline Turella. – 2020.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, 2020.

Orientação: Venina dos Santos.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Filtração por membranas. 2. Vinho. 3. Pesticidas. I. Santos, Venina dos, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 66.081.6

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Paula Fernanda Fedatto Leal - CRB 10/2291

TAÍS CAROLINE TURELLA**“Avaliação da remoção de pesticidas em vinho branco por membranas de microfiltração”**

Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos e Tecnologias.

Caxias do Sul, 15 de dezembro de 2020.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Venina dos Santos
Orientadora
Universidade de Caxias do Sul

Prof. Dr. Carlos Pérez Bergmann
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Camila Baldasso
Universidade de Caxias do Sul

Profa. Dra. Rosmary Nichele Brandalise
Universidade de Caxias do Sul

AGRADECIMENTOS

Em meio a tantos desafios durante esta trajetória, estes são meros agradecimentos aos envolvidos no desenvolvimento deste trabalho, mediante a gratidão que tenho a todos.

Agradeço a Deus e a todos seres de luz que me conduzem diariamente e me dão forças (muitas vezes irrealis), para prosseguir com meus objetivos e finalizá-los com sucesso.

À Minha família. Por sermos tão unidos e estarmos sempre nos ajudando. Poderia escrever um livro sobre este parágrafo, mas guardo em meu coração.

Agradeço imensamente à minha orientadora Professora Dra. Venina dos Santos, que desde a época de iniciação científica me fez crescer muito como estudante. Por isso a escolhi como orientadora, pois sabia que estaria em ótimas mãos. Além disso, se tornou uma das minhas mães adotivas e sempre cedeu seu tempo a me ouvir presencialmente ou por telefone. São tantas histórias que com certeza serei a orientanda que ela não esquecerá, e eu não esquecerei do apelido carinhoso no qual me deu: “lindinha”.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, que foram meus mentores, amigos e conselheiros ao longo deste mestrado. Através de suas lições me transmitiram conhecimentos essenciais e motivação para realização deste trabalho.

Aos meus colegas de mestrado, que entraram na minha vida para se tornarem amigos para todas as horas. Pessoas especiais e maravilhosas que ganhei de presente e que vou lembrar para sempre com muito carinho. (Muitas histórias!).

À Dra. Marilda Chiarello, por sua amizade e por aceitar transmitir seus conhecimentos para a contribuição da pesquisa. Foi um prazer conhecer esta profissional incrível e uma pessoa tão amável.

À UCS, ao Laboratório de Membranas e Materiais e Laboratório de Biotecnologia de produtos naturais e sintéticos, por fornecerem os insumos e infraestrutura excelentes para as práticas e também profissionais tão bem capacitados para me auxiliar.

À Vinícola Salton e à Dra. Kellen Cristofoli, pela receptividade em nos receber e sempre estarem abertas à questionamentos sobre a produção de vinhos e demais dúvidas.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

Ao meu anjo da guarda, que aguardou o momento de eu dar a notícia de aprovação na prova de seleção do mestrado (na qual eu havia estudado muito), para então partir no mesmo dia. Desde então, ela me guia e me protege assim como fazia em terra, agora como uma estrela no céu. MÃE, obrigada por me fazer tão igual a ti, seja no físico, no químico ou no biológico, por ter me ensinado a ter tanta garra, força e fé. ESTA É MAIS UMA CONQUISTA MINHA DEDICADA A VOCÊ. TE AMO!

**“ VIRGINIANOS: *EU NÃO FAÇO AS COISAS DO MEU
JEITO, EU FAÇO DO JEITO CERTO.
O FATO DO JEITO CERTO SER O MEU JEITO É SÓ
UMA FELIZ COINCIDÊNCIA.*”**

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	11
2.	OBJETIVOS.....	13
2.1	Objetivo geral.....	13
2.2	Objetivos específicos.....	13
3.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
3.1	VINHOS.....	14
3.1.1	Dados estatísticos.....	14
3.1.2	Definição.....	15
3.1.3	Processo produtivo.....	16
3.2	PESTICIDAS.....	18
3.2.1	Pesticidas no cultivo das uvas.....	20
3.3	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS.....	23
3.3.1	Infusão direta em espectrometria de massas de alta resolução (DI- HRMS).....	24
3.3.2	Cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (HPLC-HRMS).....	24
3.3.2.1	Método de extração QUECHERS.....	25
3.3.2.2	Validação de métodos analíticos.....	26
3.4	PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS (PSM).....	28
3.5	ESTADO DA ARTE.....	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1	MEMBRANAS.....	34
4.2	CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS.....	34
4.2.1	Microscopia Eletrônica de Varredura de emissão de campo (MEV-FEG).....	34
4.2.2	Testes de permeação.....	35
4.2.2.1	Compactação das membranas.....	35
4.2.2.2	Medidas de fluxo e permeabilidade hidráulica.....	36
4.2.2.3	Ensaio de permeabilidade do vinho.....	36
4.3	CARACTERIZAÇÃO DO VINHO BRUTO E PERMEADO.....	36
4.4	ANÁLISE DOS PESTICIDAS.....	37
4.4.1	Reagentes	37
4.4.2	Preparo das soluções padrão de pesticidas.....	38
4.4.3	Microfiltração do vinho fortificado.....	38
4.4.4	Infusão direta em Espectrometria de Massas de alta resolução (DI-HRMS).....	38
4.4.5	Cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (HPLC-HRMS).....	38
4.4.5.1	Procedimento de extração.....	39
4.4.5.3	Análise instrumental.....	40
4.4.5.3	Validação do método cromatográfico	40

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1.1	CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS.....	42
5.1.1	Microscopia Eletrônica de Varredura de emissão de campo (MEV-FEG).....	42
5.1.2	Testes de permeação das membranas.....	44
5.1.2.1	Permeabilidade hidráulica.....	45
5.1.2.2	Permeabilidade do vinho.....	45
5.2	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO VINHO.....	47
5.3	ANÁLISE DE PESTICIDAS.....	49
5.3.1	Infusão direta em Espectrometria de Massas de alta resolução (DI-HRMS).....	49
5.3.2	Cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (HPLC-HRMS).....	50
5.3.2.1	Validação analítica.....	52
5.3.2.1.1	Seletividade.....	52
5.3.2.1.2	Curva de calibração e linearidade.....	53
5.3.2.1.3	Exatidão.....	54
6	CONCLUSÃO.....	56
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	57
	REFERÊNCIAS	

FIGURAS

Figura 1. Etapas da produção do vinho branco.....	17
Figura 2. Fórmula estrutural e nome oficial IUPAC.....	22
Figura 3. Representação esquemática de um PSM.....	28
Figura 4. Representação esquemática da seção transversal dos diferentes tipos de morfologia de membranas sintéticas.....	29
Figura 5. Modelo esquemático das diferentes formas de operação dos PSM (a) filtração convencional e (b) filtração tangencial.....	29
Figura 6. Dados sobre o total de artigos científicos publicados envolvendo membranas, remoção de pesticidas e remoção de pesticidas em vinhos.....	33
Figura 7. Representação esquemática do sistema de MF.....	35
Figura 8. Metodologia aplicada no procedimento de extração.....	39
Figura 9. Distribuição de tamanho de poro da membrana.....	44
Figura 10. Micrografia da seção transversal da membrana em (a) escala 50 μ m e (b) 10 μ m.....	43
Figura 11. Micrografias da membrana no MEV - a) antes da MF e b) após MF.....	43
Figura 12. Determinação da compactação das membranas.....	44
Figura 13. Permeabilidade hidráulica das membranas testadas em diferentes pressões.....	45
Figura 14. Fluxo de permeado de vinho branco em função do tempo.....	46
Figura 15. Fluxo de permeado do vinho em diferentes pressões.....	47
Figura 16. Espectro do carbendazim a) 300 ppm padrão e b) após MF.....	49
Figura 17. Cromatograma do íon selecionado carbendazim (concentração 50 ppm) padrão e após MF.....	49
Figura 18. Cromatograma do íon carbendazim.....	53
Figura 19. Cromatograma do íon carbendazim.....	53
Figura 20. Curva analítica do composto carbendazim.....	54
Figura 21. Etapas do ensaio de validação do método.....	55

TABELAS

Tabela 1. Comercialização de vinhos do RS.....	14
Tabela 2. Composição do vinho.....	15
Tabela 3. Pesticidas aplicados no cultivo das uvas.....	21
Tabela 4. Resíduos de agrotóxicos na cultura da uva.....	21
Tabela 5. Dados sobre o carbendazim e indoxacarbe.....	22
Tabela 6. Remoção de pesticidas em vinho branco e tinto.....	32
Tabela 7. Métodos de análise físico-químicas realizadas no vinho antes e após MF.....	37
Tabela 8. Resultados analíticos do vinho bruto e vinho permeado.....	48
Tabela 9. Concentração de pesticida após MF.....	50
Tabela 10. Índice de recuperação do procedimento de extração.....	54

RESUMO

O uso de pesticidas na agricultura é tema de discussões em virtude dos perigos gerados para o meio ambiente e para a saúde humana. No entanto, a proteção das culturas com métodos químicos é uma prática comum na viticultura, devido às especificidades da cultura da uva, doenças e pragas que acometem as videiras. O número de pesticidas, tipo e quantidade aplicados nas videiras variam significativamente a cada ano, dependendo das condições climáticas, crescimento de pragas, aplicação incorreta do produtor, etc. Por isso, resíduos de pesticidas são frequentemente detectados nas uvas e no vinho. Com o objetivo de desenvolver uma alternativa para a remoção de pesticidas em vinhos, este trabalho avaliou a retenção do pesticida carbendazim e indoxacarbe por microfiltração (MF) com membranas poliméricas em vinho branco. Também se avaliou a qualidade do produto final após a MF a partir de análises físico-químicas, tais como álcool, turbidez, açúcares, entre outros. As membranas testadas foram de acetato de celulose (CA) de 0,45 µm. O método de extração modificado QuEChERS (do inglês *Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe*) seguido de infusão direta em espectrometria de massa de alta resolução (DI-HRMS) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução (*liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry*, HPLC-HRMS) foram realizados para analisar resíduos de pesticidas do vinho fortificado (denominação dada ao vinho no qual foram adicionadas concentrações de pesticidas) microfiltrado. Os espectros obtidos evidenciaram que a membrana apresentou um potencial de retenção de 46 % de carbendazim e 65% de indoxacarbe após MF. Este processo preservou a qualidade do vinho, pois o mesmo não apresentou alterações em suas características físico-químicas após a MF. Portanto, a utilização de membranas poliméricas de MF se apresenta como uma alternativa promissora na remoção de resíduos de carbendazim e indoxacarbe que possam estar presentes em vinhos.

Palavras-chave: microfiltração, membranas, vinho branco, remoção de pesticidas

Abstract

The use of pesticides in agriculture is the subject of discussions due to the dangers generated for the environment and for human health. However, crop protection with chemical methods is a common practice in viticulture, due to the specificities of the grape culture, its diseases and pests. The number of pesticides, type and quantity applied to the vines varies significantly each year, depending on climatic conditions, growth of pests, incorrect application of the producer, etc. Therefore, pesticide residues are often detected in grapes and wine. In order to develop an alternative for the removal of pesticides in wines, this work evaluated the retention of the pesticide carbendazim and indoxacarb by microfiltration (MF) with polymeric membranes in white wine. The quality of the final product after MF was also evaluated through physical-chemical analyzes. The tested membranes were 0.45 μm cellulose acetate (CA). The modified QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe) extraction method followed by direct infusion in high resolution mass spectrometry (DI-HRMS) and liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (HPLC-HRMS) were performed for analysis of pesticide residues from microfiltered fortified wine. The spectra obtained showed that the membrane showed a potential for pesticide retention after microfiltration, regardless of the concentration used in the fortification. The use of MF also preserved the quality of the wine, as it showed no changes in its physical and chemical characteristics after the process. Therefore, the use of MF polymeric membranes presents itself as a promising alternative in the removal of carbendazim and indoxacarb residues that may be present in wines.

Keywords: microfiltration, membranes, white wine, removal of pesticides

1 INTRODUÇÃO

A Serra Gaúcha é uma das principais regiões no mundo no cultivo de uvas destinadas à produção de vinhos. Considerada o maior polo vitivinícola brasileiro, responde por cerca de 85% da produção de uvas destinadas ao processamento de vinhos no país (SEGUENKA *et al.*, 2014; IBRAVIN, 2020).

Devido às condições climáticas da região, as videiras estão sujeitas à incidência de doenças e pragas, que podem afetar a produção e a qualidade das uvas (MOZZAQUATRO, 2016). Para tanto, a proteção das culturas por métodos químicos é uma prática comum na vitivinicultura (DOULIA *et al.*, 2017). Em virtude da grande quantidade de pesticidas aplicados nas videiras e de deficiências nas boas práticas para a utilização, resíduos de pesticidas são detectados em níveis acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) nas uvas e no vinho (DOULIA *et al.*, 2016; CHIARELLO, 2018).

A legislação para a análise desses contaminantes em alimentos e bebidas para consumo nacional e exportação, tem se tornado cada vez mais restrita (CHIARELLO, 2018). No Brasil, o controle e a garantia do cumprimento desses requisitos necessários para que os alimentos sejam seguros é realizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a partir do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA (ANVISA, 2020a).

Acima destes LMR estabelecidos para a uva têm sido relatados malefícios à saúde humana desses compostos (WHO, 2018). Assim como podem interferir na etapa de fermentação e na qualidade do vinho produzido (MOZZAQUATRO, 2016). Quanto à influência dos pesticidas no vinho, é evidenciado que a presença de resíduos de fungicidas podem afetar a atividade metabólica dos microrganismos responsáveis pela fermentação alcoólica, influenciando nas características organolépticas finais do produto, como no *flavour* (aroma, sabor), cor, e modificação de estabilidade (CALHELHA *et al.*, (2006); OLIVA *et al.*, (2008); URKIAGA *et al.*, (2002); SÉRALINI; DOUZELET, (2017); DOULIA *et al.*, (2017)).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), combinada com espectrometria de massa de alta resolução (HRMS), são as técnicas analíticas mais adotadas para a determinação de resíduos de pesticidas em matrizes complexas, devido à sua sensibilidade e ampla faixa de detecção (CHIARELLO *et al.*, 2018; HE *et al.*, 2019). O método de extração de pesticidas denominado QuEChERS

(ANASTASSIADES *et al.*, 2003), é o método mais empregado nas análises de pesticidas (HE *et al.*, 2019).

No intuito de desenvolver uma alternativa para remoção de pesticidas em vinhos, podem ser sugeridos os processos de separação por membranas (PSM). Conforme Doulia *et al.* (2016), a escolha correta do PSM é uma forma eficaz de remover resíduos de pesticidas, úteis para os vitivinicultores, uma vez que asseguram a qualidade dos vinhos produzidos. A literatura carece de estudos sobre PSM para remoção de pesticidas em vinhos, incluindo um número limitado de membranas e pesticidas examinados. Tendo em vista que as vinícolas ainda não adotaram formas de remover esses contaminantes de seus produtos, é notável a importância do desenvolvimento de estudos nessa área, em virtude da toxicidade desses compostos, assim como de seus produtos de degradação, para a saúde dos consumidores.

Neste contexto, este trabalho visa explorar a tecnologia de PSM, utilizando membranas poliméricas de microfiltração (MF) para remoção de pesticidas em vinho branco, e adaptar métodos analíticos para a determinação de resíduos após o processo. Além disso pretende-se avaliar a qualidade do produto final após a MF, como forma de apresentar uma alternativa ao setor produtivo de vinhos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a eficiência de membranas poliméricas de microfiltração (MF) para remoção de pesticidas (carbendazim e indoxacarbe), fortificados em vinho branco.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a morfologia e permeabilidade de membranas poliméricas de acetato de celulose (AC) a partir da caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura de emissão de campo (MEV-FEG) e testes de permeação, a fim de corroborar o comportamento da membrana nos resultados obtidos;
- Analisar as características físico-químicas do vinho bruto e permeado de acordo com os parâmetros requisitados pelo MAPA (BRASIL, 1988), com o intuito de identificar influências da MF no produto final;
- Otimizar e validar um método de extração a partir da adaptação do método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe) para determinação dos resíduos de pesticidas carbendazim e indoxacarbe fortificados em amostras de vinho branco;
- Aplicar métodos analíticos desenvolvidos e validados, por meio de infusão direta em espectrometria de massas de alta resolução (DI-HRMS) e cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (HPLC-HRMS), para análise de pesticidas;
- Analisar o potencial das membranas de AC para a remoção dos pesticidas em amostras de vinho branco submetidas a MF, por meio de metodologia validada.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 VINHOS

3.1.1 Dados estatísticos

O mercado vitivinícola brasileiro está em constante evolução e expansão, tanto em quesitos de produção, como consumo. Por representar uma importante atividade econômica para várias regiões, principalmente no sul do país, o mercado representa uma grande parte da economia brasileira, pois ocupa a 16ª posição no ranking mundial de produção de vinhos (OIV, 2019; WÜRZ *et al.*, 2016).

O país possui uma das melhores regiões no mundo para o cultivo de uvas destinadas à produção de vinhos espumantes, sendo esta a região da Serra Gaúcha (SEGUENKA *et al.*, 2014). Considerada o maior polo vitivinícola do Brasil, responde por cerca de 85% da produção nacional de vinhos, sendo esta área reconhecida e certificada em concursos nacionais e internacionais de vinhos e espumantes (IBRAVIN, 2020).

De acordo com um levantamento da Organização da Vinha e do Vinho (OIV) (2019), o consumo brasileiro de vinhos é em média de 2 litros por pessoa por ano, cerca de 330 milhões de litros consumidos pela população anualmente, ocupando o 17º lugar no ranking mundial.

A Tabela 1 mostra os dados referentes a quantidade de vinhos comercializada no Rio Grande do Sul, conforme dados da IBRAVIN.

Tabela 1. Comercialização de vinhos do RS (Adaptado de IBRAVIN, 2018).

Vinhos de mesa (milhões de litros)				
ANO	2015	2016	2017	2018
Branco	25,7	18,7	20,6	20,8
Rosado	1,4	1,4	1,1	1,8
Tinto	180,5	145,9	152,0	169,4
TOTAL	207,6	166	173,7	192
Vinhos finos (milhões de litros)				
ANO	2015	2016	2017	2018
Branco	4,3	4,1	3,6	3,5
Rosado	0,2	0,2	0,2	0,3
Tinto	15,3	15	11,8	11,6
TOTAL	19,8	19,3	15,6	15,4

3.1.2 Definição

A Portaria nº 229 do Mapa (BRASIL, 1988a) define vinho como: “bebida obtida a partir da fermentação alcóolica completa ou parcial da uva fresca, esmagada ou não, ou do mosto (parte líquida da uva) simples ou virgem, com um conteúdo de álcool adquirido mínimo de 7% (v/v a 20 °C)”. As principais variedades de uvas cultivadas na região da Serra Gaúcha destinadas a produção de vinho são: Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot, Tannat, Tempranillo, Pinot noir, Chardonnay, Sauvignon Blanc, Viognier, Pinot Gris, Moscato branco e Trebbiano (TONIETTO *et al.*, 2012).

A matriz do vinho é considerada complexa, uma vez que este é constituído por uma grande variedade de componentes químicos e seus metabólitos (RUOCCO *et al.*, 2019). Estes componentes atuam em sinergia trazendo benefícios à saúde humana, com destaque para os componentes fenólicos da bebida (GUILFORD; PEZZUTO, 2011). A Tabela 2 apresenta as substâncias que compõem o vinho e a forma na qual se encontram no produto.

Tabela 2. Composição do vinho (Adaptado de FERNANDES, 2010; FLANZY, 2003; MORAES, 2010; MACHADO, 2015; RUOCCO *et al.*, 2019).

Substância	Formas presentes no vinho
Água	-
Açúcares	<i>D</i> -glicose, <i>D</i> -frutose
Alcoóis	Etanol, metanol
Ácidos	Ácido tartárico, málico, cítrico, láctico, succínico, acético, carbônico, sulfuroso
Aldeídos	Acetaldeído, furfural, aldeídos fenólicos
Cetonas	β -damascenona, β -ionona
Compostos fenólicos	Resveratrol, taninos, ácido benzóico, ácido vanílico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido cafeico, benzaldeído, vanilina e seringaldeído (do tipo não-flavonóides); quercetina, antocianinas e catequina (do tipo flavonóides).
Compostos nitrogenados	Amônia e nitratos (formas inorgânicas); Amidas, aminas, aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos (formas orgânicas).
Compostos sulfurados	Sulfitos inorgânicos, cisteína, tiamina, biotina
Gases dissolvidos	Dióxido de carbono, oxigênio, dióxido de enxofre
Ésteres	Derivados do ácido acético e etanol
Elementos minerais	Potássio, enxofre, cálcio, cloro e sódio

Existem diversas classificações de vinhos de acordo com a Portaria 43, de 18 de maio de 2016, do MAPA, a saber: fino, de mesa, frisante, gaseificado, leve, espumante

ou espumante natural, licoroso, filtrado doce, jeropiga, mistela momposta, conhaque, bagaceira, grappa ou graspa, aguardente de vinho, pisco, licor de conhaque Brandy, licor de bagaceira, sangria, etc. Se classificados por cor, os vinhos podem ser divididos em três categorias: branco, rose e tinto. A cor do vinho irá variar dependendo da uva que for utilizada, que poderá ser branca ou tinta, e também da forma como o vinho foi elaborado (BRUCH, 2012).

3.1.3 Processo produtivo

Geralmente, o vinho é elaborado com uvas maduras, frescas, sadias e isentas de resíduos de pesticidas e de metais pesados, provenientes do material de contato durante o armazenamento e transporte. É fundamental que a uva seja processada logo após a colheita, para que não sofra nenhum processo de oxidação devido ao esmagamento e início de fermentação alcoólica, aspectos prejudiciais à qualidade do vinho (RIZZON, 2009).

No processo produtivo do vinho branco, utilizam-se uvas brancas como Chardonnay, Sauvignon Blanc, Riesling itálico, Prosecco, Moscato, Pinot Grigio, Malvasia, Niagara, entre outras. Antes da fermentação do mosto, ocorre a separação da casca e das sementes para que não haja a passagem da matéria corante para o produto. (BRUCH, 2012).

As etapas envolvidas no processo de produção do vinho branco são apresentadas na Figura 1.

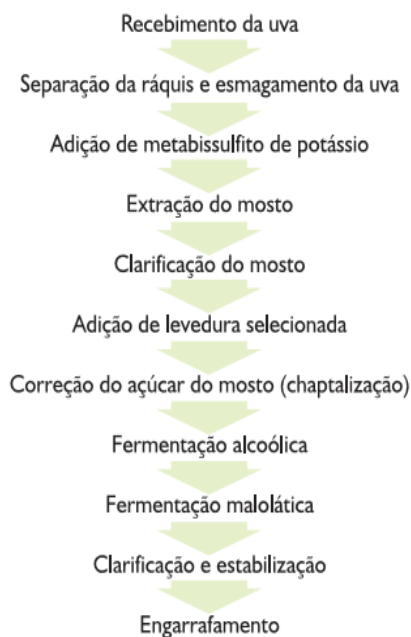


Figura 1. Etapas da produção do vinho branco (RIZZON, 2009).

A produção do vinho envolve a utilização de matérias-primas de qualidade e total controle do processo (SEGUENKA *et al.*, 2014). Na produção da uva são evidenciados diversos fatores que afetam o cultivo das videiras. As características do solo e clima da região da vindima podem comprometer o ciclo da cultura e alterar a composição e a qualidade da uva produzida (ROMAGNA, 2018). Devido a Serra Gaúcha estar localizada em uma região de clima temperado, as videiras acabam sofrendo com variáveis que influenciam no seu cultivo. Condições climáticas atípicas são observadas, como: temperaturas baixas no período de inverno, onde é comum a ocorrência de geadas, incluindo a possibilidade de neve em dias mais frios; níveis de precipitação pluviométrica intensos; exposição à radiação solar e a alta umidade do ar.

Essas condições são favoráveis ao aparecimento de doenças e epidemias nas videiras, dentre as quais são citadas o míldio, oídio, antracnose, escoriose, podridões de cacho, cancro-bacteriano, doenças de tronco, fusariose, esca, petri, pé-preto, podridões-descendentes e eutipiose (ROMAGNA; 2018; ALMANÇA *et al.*, 2015). Devido às especificidades do cultivo da uva, suas doenças e pragas, o uso de pesticidas para proteção é uma prática comum adotada pelos produtores (DOULIA *et al.*, 2016; DOULIA *et al.*, 2017; RUOCCO *et al.*, 2019).

3.2 PESTICIDAS

Segundo definição da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (em inglês, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO), “pesticida significa qualquer substância destinada a prevenir, destruir, atrair, repelir ou controlar qualquer praga, incluindo espécies indesejadas de plantas ou animais durante a produção, armazenamento, transporte, distribuição e processamento de alimentos”. O termo inclui substâncias destinadas ao uso como regulador do crescimento de plantas, desfolhante, dessecante, desbaste de frutas ou inibidor de germinação e substâncias aplicadas às culturas antes ou depois da colheita para proteger a mercadoria da deterioração durante o armazenamento e o transporte (CODEX, 2020).

Conforme Moraes (2019), pesticidas são produtos químicos sintéticos usados para o controle de pragas. Os termos pesticida, agrotóxico e agroquímico são equivalentes ao que alguns denominam em português de defensivo agrícola ou produto fitossanitário. A literatura científica internacional utiliza preferencialmente os termos pesticida e agroquímico, abrangendo produtos químicos tanto venenosos como não venenosos. O termo agrotóxico, contudo, abrange apenas produtos de toxicidade comprovada.

Já o termo “resíduo de pesticida” significa qualquer substância, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento proveniente de produtos agrícolas, bem como resíduos de fontes desconhecidas (ambientais) (CODEX, 2020).

De acordo com Chiarello (2018), os pesticidas podem ser classificados de diferentes maneiras, segundo a função, estrutura química dos ativos (grupo químico), e efeitos à saúde humana e ao ambiente. De acordo com a sua função podem ser classificados em:

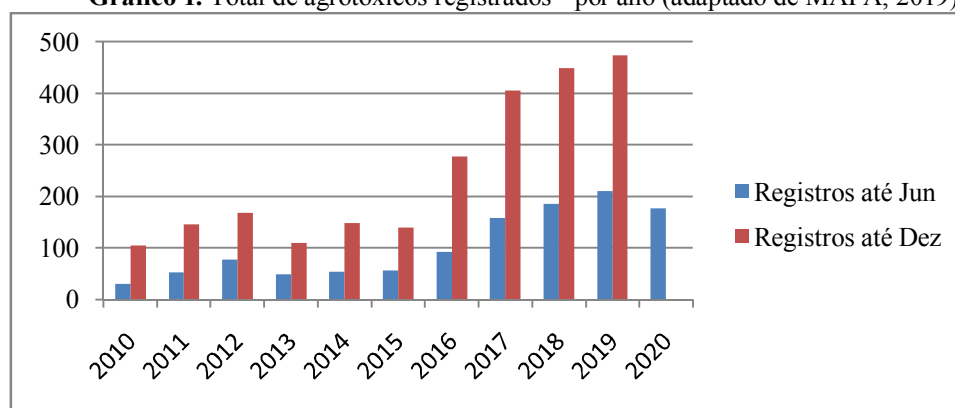
- a) inseticidas: controlam insetos;
- b) fungicidas: destroem ou inibem fungos;
- c) herbicidas: combatem plantas invasoras;
- d) desfolhantes: eliminam folhas indesejadas;
- e) fumigantes: combatem bactérias do solo;
- f) raticidas: combatem ratos e outros roedores;

- g) moluscocidas: combatem moluscos;
- h) nematicidas: combatem nematoides,
- i) acaricidas: utilizados no combate à ácaros.

Para se utilizar um agrotóxico no Brasil, é necessário que o mesmo seja registrado no país. A liberação para o uso de agrotóxicos se dá a partir da avaliação de três perspectivas: saúde, meio ambiente e da agronomia, sendo de responsabilidade, respectivamente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

A partir de 2010, houve uma crescente liberação de registros de agrotóxicos no Brasil. Em 2019, 474 novos produtos foram liberados para registro pelo MAPA. No ano de 2020, essa mesma tendência pode ser observada, através de dados obtidos até a metade do mesmo ano, conforme ilustra o Gráfico 1.

Gráfico 1. Total de agrotóxicos registrados - por ano (adaptado de MAPA, 2019).



Embora a aplicação de agrotóxicos aumente a produtividade agrícola, o seu uso intensivo gera um conjunto de externalidades negativas, bastante documentadas na literatura especializada. Impactos sobre seres humanos vão desde náuseas, dores de cabeça e irritações na pele até problemas crônicos, como diabetes, malformações congênitas e tipos de câncer. Impactos ambientais também são vários, incluindo contaminação da água, plantas e solo, diminuição no número de organismos vivos e aumento da resistência de pestes (MORAES, 2019).

A exposição do corpo humano à ação dos pesticidas se dá além do contato direto com as substâncias tóxicas, como através do solo ou da água contaminados

(WHO, 2018). Entretanto, a maior fonte de absorção destas substâncias está relacionada com a alimentação (CALHELHA et. al, 2006).

Em função de garantir a segurança alimentar, programas de monitoramento foram estabelecidos. No Brasil, a ANVISA criou o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), com o objetivo de monitorar os níveis de agrotóxicos que chegam à mesa do consumidor. Segundo a ANVISA (2020a), o PARA visa aumentar a segurança alimentar, prevenindo intoxicações agudas ou crônicas resultantes da exposição indevida aos pesticidas. Este programa monitora os alimentos comercializados, os quais devem apresentar níveis de resíduos de agrotóxicos abaixo dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos para cada agrotóxico. Além disso, possibilita verificar se os pesticidas utilizados são registrados no país e se foram aplicados em culturas para as quais eles foram autorizados.

As deficiências nas boas práticas para a utilização de agrotóxicos nos alimentos implicam no possível aparecimento de resíduos em níveis acima dos LMR. Esses riscos estão relacionados com o desrespeito às instruções de uso apresentadas na bula dos agrotóxicos, tais como dosagem, forma de aplicação, período de carência e indicação de uso (WHO, 2018).

3.2.1 Pesticidas no Cultivo das Uvas

Quanto a presença de diferentes contaminantes em vinhos, citam-se a presença de resíduos de pesticidas, ácido acético, bactérias, fungos, metais, micotoxinas, dentre outros (GUILFORD; PEZZUTO, 2011; RUOCCO et. al, 2019). No controle químico da videira, devem ser utilizados agrotóxicos registrados no MAPA. A Tabela 3 apresenta os pesticidas mais utilizados na produção das uvas.

Tabela 3. Pesticidas aplicados no cultivo das uvas (adaptado de ANVISA 2019; PPDB, 2019).

Pesticida	Grupo Químico	Fórmula Química	Massa Molecular (g/mol)	Solubilidade em Água (mg/L)	Log Kow	Função	LMR (mg/kg)
Azoxistrobina	Estrobilurina	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	403,4	6,7	2,5	fungicida	1
Cimoxanil	Acetamida	C ₇ H ₁₀ N ₄ O ₃	198,1	780	0,67	fungicida	0,2
Dimetomorfe	Morfolina	C ₂₁ H ₂₂ ClNO ₄	387,8	28,95	2,68	fungicida	2
Fenamidona	Imidazolinona	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ OS	311,4	7,8	2,8	fungicida	0,2
Folpet	Dicarboximida	C ₉ H ₄ Cl ₃ NO ₂ S	296,5	0,8	3,02	fungicida	0,02
Imidacloprid	Neonicotinóide	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	255,6	610	0,57	inseticida	1
Metalaxil	Acilalaninato	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	279,3	8400	1,75	fungicida	1
Pirimetanil	Anilino pirimidina	C ₁₂ H ₁₃ N ₃	199,2	121	2,84	fungicida	5
Tiofanato metílico	Benzimidazol	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S ₂	342,3	18,5	1,4	fungicida	0,7

Os vinhos não devem apresentar contaminante microbiológico, orgânico e inorgânico ou resíduo de agrotóxico em quantidade superior aos limites estabelecidos em legislação específica do MAPA e da ANVISA (MAPA, 2016). Ainda não existe legislação relativa aos resíduos de pesticidas em vinho, recorrendo-se a uma aproximação dos limites de resíduos de pesticidas estipulados para as uvas.

A Portaria Nº 267, de 11 de dezembro de 2019 do MAPA apresenta os resultados do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) de diversas culturas, entre elas a da uva, entre o período de 2015 a 2018 (MAPA, 2019). A Tabela 4 apresenta os resultados em relação à presença de resíduos de agrotóxicos em uvas neste período.

Tabela 4. Resíduos de agrotóxicos na cultura da uva (adaptado de MAPA, 2019).

Ano	Amostras com detecção (%)	Amostras sem detecção (%)
2015	72,09	29,91
2016	79,01	20,99
2017	83,49	16,51
2018	71,43	28,57

Como se observa, as amostras com detecção de resíduos de agrotóxicos na cultura da uva são apresentadas em proporção significativamente mais expressiva em relação às amostras sem detecção. Neste sentido, torna-se oportuno analisar resíduos de

pesticidas em vinhos, pois as uvas se apresentam na lista de maior número de aplicações de pesticidas na agricultura do país (MOZZAQUATRO, 2016).

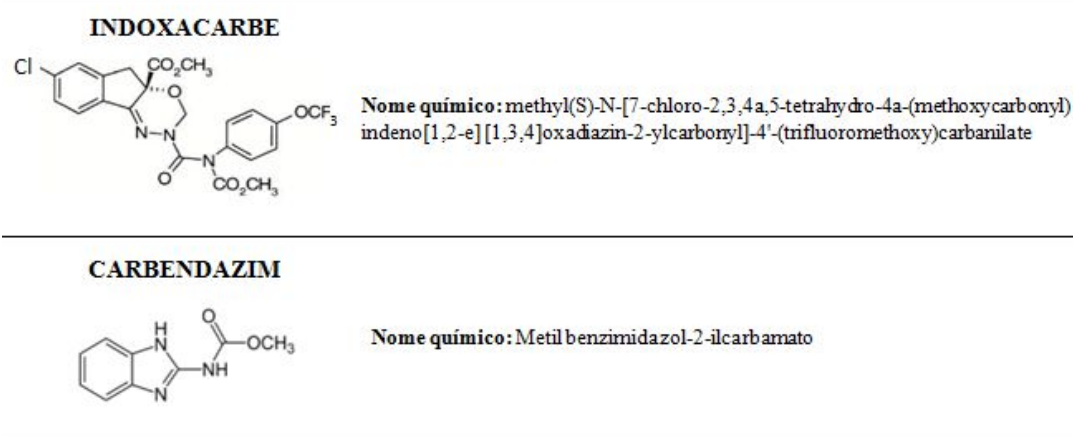
A Tabela 5 e Figura 2 apresentam informações e as estruturas químicas dos pesticidas carbendazim e o indoxacarbe, respectivamente.

Tabela 5. Dados sobre o carbendazim e indoxacarbe (adaptado de ANVISA, 2019; PPDBa, 2019; PPDBb, 2019).

Pesticida	Grupo Químico	Fórmula Química	Massa Molar (g·mol ⁻¹)	Solubilidade em Água (mg·L ⁻¹)	log Kow	LMR (mg·kg ⁻¹)
Carbendazim	Benzimidazol	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	191,2	8	1,52	NPC*
Indoxacarbe	Oxadiazina	C ₂₂ H ₁₇ ClF ₃ N ₃ O ₇	527,83	0,2	4,65	0,07

*Não Permitido para a cultura

Figura 2. Fórmula estrutural e nome oficial IUPAC (adaptado de ANVISA, 2019).



O carbendazim é utilizado como fungicida de amplo espectro, possuindo atividade sistêmica de inibição da formação de microtúbulos mitóticos durante a mitose, afetando o crescimento e a divisão dos esporos. O mesmo foi considerado mutagênico e tóxico para a reprodução e para o desenvolvimento pelas principais autoridades regulatórias internacionais (PMRA, 2011; EFSA, 2010; APVMA, 2012; USEPA, 2014).

No Brasil, o carbendazim é um fungicida com uso aprovado como preservante de madeira e agrícola (aplicação foliar nas culturas de algodão, citros, feijão, maçã, milho, soja e trigo e para o tratamento de sementes de algodão, arroz, feijão, milho e soja). Seu uso não é permitido para a cultura da uva, mas mesmo assim acaba sendo detectado em amostras, como apresentado na Tabela 1 (ANVISA, 2020).

Quanto ao seu uso em outros países, o que impacta na importação da uva e seus derivados, o carbendazim foi proibido na União Europeia (EFSA, 2010) ao ser

classificado como 1B para toxicidade reprodutiva e mutagenicidade de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Substâncias Químicas (GHS – *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*). Nos EUA (USEPA, 2014), não há aprovação para uso agrícola, sendo autorizado apenas para uso em plantas ornamentais e como preservativo industrial. No Canadá, o Carbendazim foi aprovado exclusivamente para uso não agrícola como preservativo industrial (PMRA, 2006 e 2011). Já na Austrália (APVMA, 2012), houve a manutenção do uso agrícola para várias culturas, mas com restrições após a reavaliação (proibição do uso em plantas ornamentais, gramados, uva, maçã e pera) (ANVISA, 2018).

Este fungicida é o primeiro colocado da lista de ingredientes ativos de agrotóxicos que terão reavaliação toxicológica a partir de uma nova metodologia de seleção desenvolvida pela Anvisa. Os aspectos toxicológicos que motivam a reavaliação do carbendazim são as suspeitas de mutagenicidade, carcinogenicidade, toxicidade para o desenvolvimento e toxicidade reprodutiva (ANVISA, 2020).

O indoxacarbe é um inseticida com uso em uma ampla variedade de culturas, que tem por finalidade o controle de certos lepidópteros, baratas e formigas (PPDB, 2019b). Este tem seu uso permitido para a cultura da uva, e onforme a Anvisa (2019), possui Classificação toxicológica Classe I, ou seja, extremamente tóxico.

Os dados do PNCRC (MAPA, 2019), sobre a presença de indoxacarbe na uva, apresentou resultados onde foram detectados resíduos deste pesticida acima do LMR estabelecido para a cultura, que é de $0,07 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS

Visto que, o vinho é considerado uma matriz complexa e as concentrações de pesticidas são muito baixas, há necessidade de métodos analíticos sensíveis e seletivos o suficiente para a identificação e quantificação desses contaminantes. Com isso, tão importante quanto o método analítico, capaz de detectar uma variedade de contaminantes orgânicos em nível de traços, também se faz necessário um bom procedimento de preparo de amostra (CHIARELLO, 2018). A seguir são explicados os métodos analíticos utilizados para atender os objetivos deste estudo.

3.3.1 Infusão Direta em Espectrometria de Massas de Alta Resolução (DI-HRMS)

Inicialmente, realizaram-se análises por infusão direta (DI, do inglês *Direct Infusion*) utilizando HRMS, para identificar os resíduos de pesticidas no vinho após a MF. A infusão direta é método de introdução de amostra em fase líquida no qual a mesma é bombeada a uma vazão contínua para o espectrômetro de massas (VESSECCHI *et al.*, 2011). Esta análise direta do extrato foi utilizada por exigir pouco preparo da amostra. Apesar da DI-HRMS ser uma ferramenta analítica poderosa para análise qualitativa dos compostos químicos gerados, não é um método ideal para análises quantitativas de amostras complexas, devido ao efeito de supressão iônica para alguns compostos. Sendo assim, a utilização de métodos cromatográficos para a separação prévia dos compostos é mais recomendável para análises quantitativas dos compostos identificados previamente por DI-HRMS.

3.3.2. Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HPLC-HRMS)

A cromatografia acoplada à espectrometria de massas provou ser uma das técnicas mais importantes empregadas para análise de pesticidas em uma ampla gama de matrizes. Tais métodos têm sido utilizados na determinação dos níveis de pesticidas em vegetais (LIANG *et al.*, 2017), mel de abelhas (KILJANEK *et al.*, 2017), água (CHIARELLO *et al.*, 2016), suco de uva brasileiro (ALVES *et al.*, 2014), solo, vinhos, sangue, entre outros.

A cromatografia líquida é considerada mais abrangente em relação à análise de matrizes e analitos e tem sido amplamente utilizada acoplada à espectrometria de massa (BORDIN *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2018; RAMADAN *et al.*, 2016). De fato, sistemas de separação cromatográfica acoplados a espectrometria de massa de alta resolução (HRMS ou Q-TOF) estão sendo cada vez mais incorporados ao trabalho de rotina dos laboratórios de monitoramento de resíduos de pesticidas. Os analisadores de espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) fornecem um conjunto de informações sobre os compostos alvo, incluindo razão isotópica, fragmentação e a massa exata, com melhor resolução (LÓPEZ-GUTIÉRREZ *et al.*, 2016; PEYSSON, 2013). Com isso, métodos de análise usando HRMS foram desenvolvidos em diferentes

matrizes, mas ainda existe uma demanda pela verificação de traços de compostos em matrizes como as deste estudo.

3.3.2.1 Método de extração QuEChERS

Como a quantidade das substâncias ativas de trabalho estão em concentrações baixas, na faixa de ppm ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) ou ppb ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), necessita-se não só de métodos e técnicas instrumentais avançadas, mas de métodos de extração da amostra. Portanto a etapa de extração tem como finalidade pré-concentrar e limpar a amostra, ou seja, eliminar possíveis interferentes da matriz e obter o analito desejado.

Para auxiliar nos métodos tradicionais de extração, Anastassiades *et al.* (2003), apresentaram um método de extração de pesticidas denominado QuEChERS, que significa rápido, fácil, barato, eficiente, robusto e seguro. Apesar do método original funcionar adequadamente, diversas modificações foram realizadas desde a primeira versão.

O procedimento é baseado em uma extração que utiliza acetonitrila como solvente para extrair os compostos da amostra. A acetonitrila permite a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra, proporcionando a extração de uma ampla faixa de pesticidas com diferentes polaridades, facilitando posterior análise (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; HAN *et al.*, 2016).

A partição líquido-líquido é realizada com sais (NaCl e MgSO_4) e tampões. A adição de sais neste processo é usada, devido à rapidez e baixo custo, além de proporcionar uma separação das fases orgânica e aquosa (CHIARELLO, 2018). O NaCl é usado, pois incrementa a força iônica do meio para melhor extração, removendo os componentes polares da matriz, e o MgSO_4 por ser higroscópico absorve a água (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). A fase orgânica, obtida após centrifugação, é submetida a uma etapa de limpeza adicional, onde é realizada em matrizes mais complexas, com a função de reter as interferências da matriz (CHIARELLO, 2018). Na segunda etapa de extração, são empregados sais secantes, os quais possuem a finalidade de melhorar a recuperação dos pesticidas, como sulfato de magnésio anidro, e adsorventes, como amina primária e secundária (*primary secondary amine* – PSA) e octadecilsilano (C18).

3.3.2.2. Validação de métodos analíticos

A validação demonstra que determinado procedimento analítico é adequado, ou seja, que atende a parâmetros e critérios de aceitação estabelecidos. Para tanto, um estudo experimental é realizado, que consiste em confirmar que o método possui confiabilidade, assegurando que os produtos estejam enquadrados nas determinações legais. Portanto, é necessário conhecer o método e seu alcance, o analito, sua concentração (LMR, nível) e a matriz estudada (CHIARELLO, 2018).

Conforme a norma SANTE/11813/2017, o método deve ser testado para avaliar sensibilidade, linearidade, recuperação média (como uma medida de exatidão), precisão (como repetitividade), efeito matriz e limite de quantificação (LOQ). Para aspectos de validação quantitativa, parâmetros de identificação devem ser avaliados, como a razão isotópica e tempo de retenção.

Os parâmetros envolvidos no processo de validação de métodos analíticos testados e validados no trabalho são descritos a seguir.

a) Seletividade

A seletividade de um método é a capacidade que o mesmo possui de medir um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz, sob condições estabelecidas no ensaio (ABNT, 2005). É um parâmetro de validação de método importante, principalmente, na análise de amostras complexas, como na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (CHIARELLO, 2018). Assim, a habilidade dos métodos de extração, de purificação, de *clean-up*, de separação e detecção estão aliados à seletividade, realizando a distinção entre o analito de interesse de outros compostos (SANTE/11813/2017, 2017). Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão serão comprometidas; portanto, esta garante que o sinal analítico seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI *et al.*, 2004).

A seletividade do método é avaliada fazendo injeções no cromatógrafo com a matriz “branco”, ou seja, ausente dos contaminantes em estudo, e com a amostra fortificada com os analitos. Após, os cromatogramas são comparados, avaliando assim a ocorrência de coeluição entre as substâncias de interesse e interferentes da matriz (CHIARELLO, 2018).

b) Linearidade e Curva Analítica

A linearidade é a habilidade de um método analítico de produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma determinada faixa de concentração (ABNT, 2005), para melhor verificação deve conter no mínimo cinco níveis (SANTE/11813/2017, 2017).

Experimentalmente, a linearidade é determinada por meio de curvas analíticas, que são gráficos de calibração e relacionam a resposta do equipamento em função de faixas de concentrações definidas. Em métodos sensíveis, diferenças na concentração do analito causam variação perceptível no valor do sinal medido (CHIARELLO, 2018).

De acordo com os critérios de aceitação, são elaboradas curvas de calibração, onde a relação gera uma equação de regressão linear $y = ax + b$, que relaciona as duas variáveis x e y e produz os coeficientes de regressão a (inclinação da curva) e b (interseção da curva analítica com o eixo y). A equação é válida para um intervalo determinado de concentração do analito. Além disso é possível estimar a qualidade da curva analítica, calculando o coeficiente de correlação r . Valores de r devem estar acima de 0,99, recomendados pela (ANVISA, 2017) e (ABNT, 2005), já o INMETRO em 2018, no seu documento sobre validação, consta como aceitável um r superior a 0,90.

A faixa linear de um ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito onde é possível demonstrar a determinação com linearidade, exatidão e precisão. É a faixa de concentração na qual a detectabilidade pode ser considerada constante (INMETRO, 2018).

c) Exatidão

A exatidão pode ser avaliada a partir dos ensaios de fortificação e recuperação das amostras. É o grau de concordância entre o valor médio obtido em uma série de resultados de um ensaio e o valor verdadeiro. A exatidão se expressa em termos de recuperação, em geral, são aceitos intervalos de recuperação entre 70 e 120%, com precisão de até 20% para a maioria dos métodos analíticos, inclusive para análise de resíduos de agrotóxicos (ABNT, 2005; SANTE, 2017). Um intervalo de 60-140% pode ser usado para recuperações individuais para análise de rotina (SANTE, 2017). Geralmente é expressa em percentual, podendo ser calculada por meio da Equação 1.

Recuperação(%) = Área do pico do analito na amostra/área do analito no padrão (1)

3.4 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS (PSM)

Os principais PSM compreendem a microfiltração (MF), ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF), osmose inversa (OI), diálise, eletrodialise, pervaporação e separação de gases. Para que se realize o transporte de uma substância através da membrana, é preciso que seja exercida uma força impulsora sobre a solução de alimentação. Para isso existem diferentes forças motrizes capazes de exercer esta função como gradiente de pressão, concentração e de potencial químico ou elétrico (HABERT *et al.*, 2006).

A membrana é uma barreira seletiva que separa duas fases, restringindo total ou parcialmente a condução de uma ou várias espécies químicas presentes nas fases (Figura 3), possuindo propriedades físico-químicas direcionadas à retenção do componente da mistura a ser retido, tais como tamanho de poro, pressão transmembrana, velocidade de fluxo e agentes químicos associados a fenômenos físico-químicos superficiais (MULDER, 1991). Na operação de filtração há produção de duas correntes efluentes: permeado e concentrado. O permeado é a corrente que passa pela membrana, e nele são encontradas poucas ou nenhuma partícula maior que o tamanho médio de poros da membrana. O concentrado, por sua vez, é a corrente rica em partículas maiores, que são incapazes de permear a membrana (CHEREMISINOFF, 1998; MULDER, 1991).

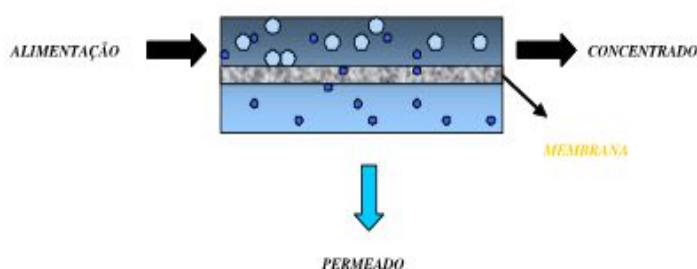


Figura 3. Representação esquemática de um PSM (MULDER, 1991).

As membranas podem ser classificadas em densas ou porosas, isotrópicas (simétricas), onde o tamanho do poro é praticamente constante ao longo de toda membrana ou anisotrópicas (assimétricas), apresentando tamanho de poro variado ao longo da membrana (HABERT *et al.*, 2006), conforme ilustra a Figura 4.



Figura 4. Representação esquemática da seção transversal dos diferentes tipos de morfologia de membranas sintéticas (adaptado de HABERT *et al.*, 2006).

Para caracterização de membranas são utilizados métodos tais como, análise morfológica e determinação da camada seletiva, realizada por microscopia, análise de permeabilidade e retenção realizada por medição de fluxos de permeado e análises de alíquotas do permeado e da solução de entrada. Se categorizadas por forma e configuração modular, podem vir em módulos de placas, tubulares, espirais ou fibras ocas e capilares. Os dois tipos de escoamento que podem ser utilizados são o modo convencional (*dead-end*) e o modo tangencial (*cross-flow*) (CHEREMISINOFF, 1998; MULDER, 1991), apresentados na Figura 5.

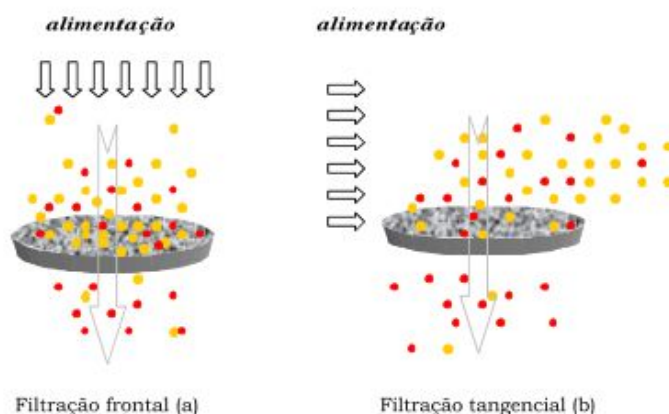


Figura 5. Modelo esquemático das diferentes formas de operação dos PSM (a) filtração convencional e (b) filtração tangencial (MULDER, 1991).

Os processos de separação por membranas, considerando-se apenas solvente puro, se enquadram na definição clássica de filtração, ou seja, são processos hidrodinâmicos onde a vazão volumétrica de fluido é diretamente proporcional a um gradiente de pressão transversal ao meio filtrante, e inversamente proporcional à resistência ao escoamento imposta pela conectividade, tortuosidade, tamanho médio de poros e torta de filtração gerada no decorrer da operação (CHEREMISINOFF, 1998). Na filtração frontal a alimentação se dá perpendicularmente a posição do meio de

separação (filtro ou membrana) e, no decorrer do processo, observa-se uma variação do fluxo permeado. Geralmente, ocorre a formação de “torta”, isto é, deposição de material na superfície do meio filtrante e este fator contribui para o aumento da resistência à transferência de massa, opera-se permanentemente em regime transiente (CHEREMISINOFF, 1998).

As membranas são produzidas a partir de duas classes distintas de material. Os materiais orgânicos, em sua grande maioria polímeros como a polissulfona (PSf), polietersulfona (PES), poliacrilonitrila (PAN), polifluoreto de vinilideno (PVDF), acetate de celulose (AC) entre outros. Também de materiais inorgânicos, como cerâmicas, carbon, óxidos metálicos e metais (HABERT *et al.*, 2006).

Se efetua a escolha do tipo de membrana em função das características do produto a ser filtrado, como por exemplo, pH, tamanho de partículas, produto que se quer obter, durabilidade e facilidade de limpeza da membrana. Quanto às membranas orgânicas, Habert *et al.* (2006), ressalta a vantagem destas apresentarem menor custo de produção do que as inorgânicas. Zoubeik *et al.* (2017) trazem como vantagem a sua alta eficácia de remoção aliada a baixos requisitos de energia. No entanto, as inorgânicas apresentam uma maior vida útil e permitem limpezas mais eficientes (HABERT *et al.*, 2006).

Apesar das vantagens, a MF com o uso de membranas, tanto cerâmicas quanto poliméricas, apresentam fatores limitantes quanto ao fluxo de permeado, o qual tende a diminuir em função do tempo. El Rayess *et al.* (2011) citam o acúmulo de substâncias próximas à superfície da membrana, designado de polarização por concentração, e o *fouling* que é caracterizado por um conjunto de fatores, tais como bloqueio de poros, adsorção, precipitação de substâncias, entre outros.

Uma das maneiras de minimizar a redução do fluxo de permeado é fazer com que o processo opere abaixo do fluxo crítico. Field *et al.* (1995) definem o fluxo crítico como sendo o maior fluxo de permeado no qual não se observa a diminuição do fluxo com o tempo. Acima desse fluxo crítico é observado o *fouling* irreversível, pois nesta condição ocorre um maior arraste das partículas que causam a formação da torta. O fluxo limite é alcançado quando, à medida que a pressão do sistema aumenta, o fluxo de permeado deixa de ser linear tendendo a estabilizar. O fluxo limite corresponde ao fluxo para o qual a ocorrência de *fouling* reduz a permeação pela membrana e ocorrem alterações de viscosidade e concentração na solução.

3.5 ESTADO DA ARTE

Vários trabalhos têm sido publicados sobre a determinação de pesticidas em vinhos. Métodos sensíveis e seletivos têm sido empregados, mostrando que, em alguns casos, esses agroquímicos aplicados no solo ou na matéria-prima podem ser encontrados no produto acabado (DOULIA et al., 2016; HE et al., 2019). Cerca de 200 resíduos de pesticidas já foram detectados em uvas e vinhos (HAN; LI, 2016). Assim como há a degradação dos pesticidas originando o aparecimento de compostos que inicialmente não estariam presentes. Esses produtos de transformação são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentos a partir de condições adequadas de temperatura ambiente e umidade. Em seu estudo, Chen (2017), ressalta que mais de 300 tipos de micotoxinas já foram encontradas e que estas podem ser tão ou mais perigosas para a saúde e para o ambiente como os próprios pesticidas. He et al. (2019), desenvolveram e validaram um método simultâneo para identificação e determinação de resíduos de pesticidas e micotoxinas em 64 amostras de vinhos, por QuEChERS modificado e UHPLC–MS/MS. A metodologia adotada se mostrou eficiente, pois detectou 49 resíduos de pesticidas e 17 micotoxinas simultaneamente.

Angioni et. al., (2011) reportaram que os processos de vinificação (esmagamento, maceração, fermentação, sangria, prensagem, filtração, etc.), reduzem a concentração de resíduos de pesticidas até certo ponto. Quando a quantidade residual atinge um determinado nível, o contaminante não só inibe a fermentação, mas também afeta a qualidade sensorial do vinho (WANG et al., 2016). Calhella *et al.* (2006) evidenciaram em seu estudo, que a presença de fungicidas em vinhos, pode afetar a atividade metabólica dos microrganismos responsáveis pela fermentação alcoólica, influenciando nas características organolépticas finais do produto. Oliva *et al.* (2008) analisaram os efeitos dos resíduos de diversos fungicidas na composição do aroma dos vinhos Monastrell. Os autores observaram que ambos os tratamentos com fungicidas afetaram a composição do aroma do vinho.

De acordo com Burggraaf & Cot (1996), as membranas de MF com tamanhos de poro maiores que 0,4 μm não influenciam nas características do vinho, enquanto que tamanhos de poros de 0,25 μm ou menores podem provocar algum desequilíbrio nas características organolépticas.

Doulia *et al.*(2016), investigaram a microfiltração, com seis membranas

poliméricas com tamanho de poro de 0,45 μm , na remoção de 23 pesticidas em vinhos branco e tinto. A eficácia da filtração foi correlacionada ao tipo de membrana e à estrutura química dos pesticidas e suas propriedades (coeficiente de partição octanol-água ($\log k_{ow}$) e solubilidade em água). Os resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Remoção de pesticidas em vinho branco e tinto (DOULIA *et al.*, 2016).

Membrana	AC	NC	CR	PES	NY	PA
Remoção vinho branco (%)	37.8 \pm 5.0	26.6 \pm 5.4	17.7 \pm 4.1	22.9 \pm 5.9	21.8 \pm 4.6	14.8 \pm 4.6
Remoção vinho tinto (%)	41.3 \pm 5.1	36.6 \pm 4.3	33.1 \pm 3.5	25.6 \pm 5.0	19.4 \pm 5.6	23.5 \pm 6.8

AC= acetato de celulose; NC= nitrato de celulose; PES= polietersulfona; NY= nylon; CR= celulose regenerada; PA= poliamida

Como pode ser observado, as membranas de AC e NC foram as que tiveram maior significância na remoção de pesticidas para ambos os vinhos, seguida de PES, NY, RC e PA para o vinho branco, e RC > PES > PA > NY para o vinho tinto.

Um grande número de métodos multiresíduos para determinação de pesticidas em produtos agrícolas e especialmente vinhos é relatado na literatura. Porém em 2020, são encontrados poucos trabalhos de pesquisa que utilizaram a MF como método para remoção de pesticidas em vinhos (DOULIA *et al.*, 2016). Conforme os mesmos autores, o efeito de propriedades de pesticidas, particularmente solubilidade em água e coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), na persistência de pesticidas da videira para o vinho, durante a vinificação, também foi examinado de forma limitada.

O levantamento em banco de dados do ScienceDirect, sobre o número de artigos científicos publicados no período entre 2015 a 2019, e que abordaram como palavras-chave: membranas, remoção de pesticidas e remoção de pesticidas em vinhos. É apresentado na Figura 6 os resultados obtidos para cada palavra-chave, respectivamente.

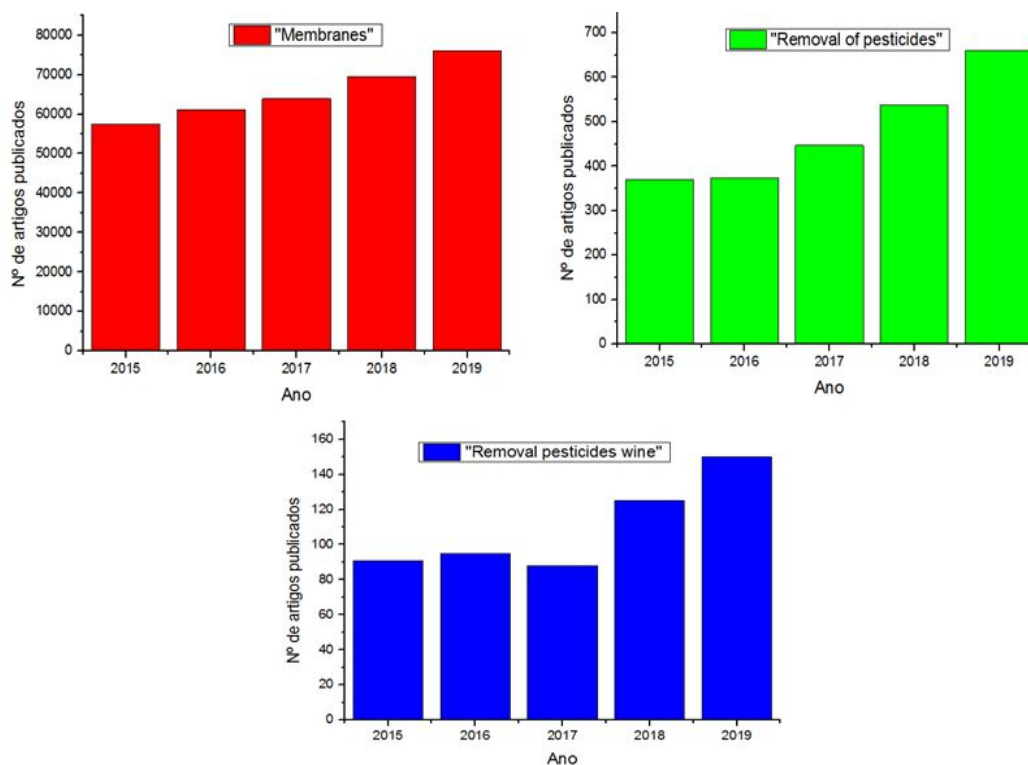


Figura 6. Dados sobre o total de artigos científicos publicados envolvendo membranas, remoção de pesticidas e remoção de pesticidas em vinhos (SCIENCE DIRECT, 2020).

Como pode ser observado, tanto o termo “membranes” quanto “removal of pesticides” apresentaram aumento no número de artigos científicos publicados durante o período avaliado. Já o termo “removal pesticides wine” também apresentou este mesmo comportamento, porém em um número menos expressivo quando comparado aos demais. Ao longo de toda a revisão bibliográfica apresentada e das considerações, fica evidente o interesse científico em adotar PSM em seus estudos, assim como o desenvolvimento de métodos analíticos para detectar contaminantes em vinhos. Além da necessidade de ampliar o número de pesquisas que se propõe a resolver essa problemática devido à relevância do tema.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a avaliação do potencial das membranas de acetato de celulose na remoção de pesticidas no vinho por MF, foi utilizado o vinho branco seco, da variedade *trebiano*, safra 2018, proveniente da região da Serra Gaúcha, fornecido pela Vinícola Salton S.A (Bento Gonçalves). O vinho utilizado para os ensaios foi recolhido logo após o término da fermentação alcoólica e designado como vinho bruto. O vinho adotado neste trabalho como “fortificado”, é o qual foram adicionadas concentrações conhecidas dos padrões de pesticidas a serem analisados. Os demais materiais e métodos a serem utilizados estão descritos neste capítulo.

4.1 MEMBRANAS

Foram utilizadas membranas comerciais planas de acetato de celulose, com tamanho de poro nominal de 0,45 μm , hidrofílica, com área de permeação de 0,13 m^2 , da Sartorius Biolab Products.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura de Emissão de Campo (MEV-FEG)

A MEV-FEG foi utilizada para avaliar a morfologia da secção transversal e da superfície de membranas, assim como a distribuição de tamanho de poros. Com base em Habert *et al.*, (2006), esta técnica permite uma caracterização rápida e precisa da estrutura porosa de membranas de MF, pois os microscópios eletrônicos de varredura apresentam um limite de resolução de 0,01 μm , e, por este motivo, é possível uma boa caracterização de membranas de MF que apresentem poros na faixa de de 0,1 a 10 μm . Na análise se utilizou o equipamento Tescan Mira3. As amostras foram previamente revestidas com Au. A tensão de aceleração utilizada neste ensaio foi de 10 e 15 kV. Essa análise foi realizada o Laboratório de Microscopia da Universidade de Caxias do Sul.

4.2.2 Testes de permeação

Para o desenvolvimento deste trabalho, foi utilizada uma unidade experimental de MF em escala de bancada (Figura 7). O módulo de membranas é do tipo placa plana e foi operado com fluxo *dead-end*. Os fluidos (água, vinho bruto e vinho fortificado) foram bombeados do tanque de alimentação para o sistema de MF. O volume de alimentação utilizado foi de 400 mL em todos testes. Os fluidos foram resfriados para manter a temperatura de trabalho entre $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ durante os ensaios. Estes foram realizados no Laboratório de Membranas e Materiais (LAMEM) da UCS.

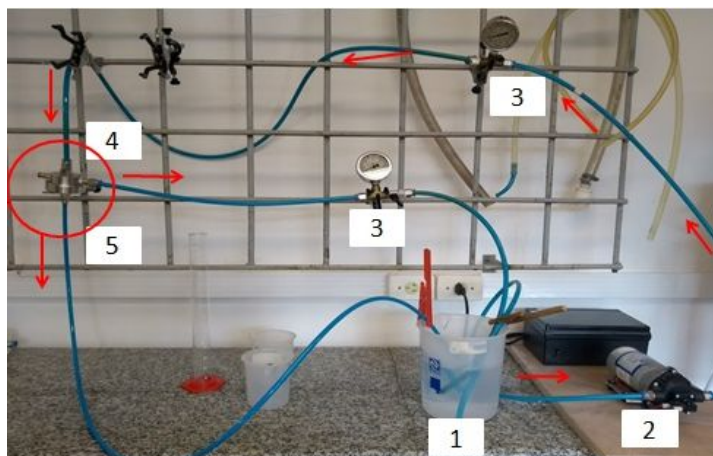


Figura 7. Representação esquemática do sistema de MF onde: (1) abastecimento; (2) bomba; (3) manômetros; (4) módulo de membrana e (5) permeado

4.2.2.1 Compactação das Membranas

A compactação das membranas teve como objetivo minimizar alterações na estrutura das membranas durante os ensaios. Foi realizada sempre a cada novo ensaio, de forma a garantir que toda membrana testada fosse submetida às mesmas condições previamente. Os ensaios de compactação da membrana foram realizados com água destilada ao início de cada MF, verificando-se sua permeabilidade hidráulica para, na sequência, se proceder com os ensaios de MF do vinho (CRISTOFOLI, 2016).

A compactação das membranas foi realizada até a obtenção de fluxo permeado de água constante com o tempo. As membranas foram compactadas em diferentes pressões, iniciando pela pressão de operação para a MF do vinho, ou seja, 3 bar, seguido por 2,5; 2,0; 1,5; 1,0 e 0,5 bar.

4.2.2.2 Medidas de Fluxo e Permeabilidade Hidráulica

As membranas apresentam propriedades relacionadas ao processo de separação, tais como o fluxo e a permeabilidade hidráulica. O fluxo é representado pela vazão (volumétrica, mássica ou molar) de permeado por unidade de área de permeação da membrana. Para fluxos volumétricos, a equação para a sua obtenção está descrita na Equação 2.

$$J_p = V / A \cdot t \quad (2)$$

Sendo: J_p ($L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$) é o fluxo de permeado, V : volume de permeado (L), A : área filtrante da membrana (m^2), t : o tempo necessário para permear determinado volume do líquido(h).

A permeabilidade hidráulica foi obtida pelo coeficiente angular da regressão linear das medidas de fluxo permeado obtidos em cada pressão transmembrana (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 e 3 bar) durante 30 min, com coleta de permeado a cada 10 min. Para cada nova pressão foi esperado um tempo de 5 minutos para iniciar a contagem do fluxo, para que o sistema entre em equilíbrio à pressão aplicada (ZANINI *et. al*, 2017).

4.2.2.3 Ensaio de Permeabilidade do Vinho

Foram realizados ensaios de permeabilidade com o vinho após a compactação da membrana. Os valores de fluxo de permeado foram obtidos realizando a coleta do permeado a cada 10 min, por 1 min. Testou-se diferentes pressões transmembrana para avaliação do comportamento do vinho, sendo elas 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 e 3 bar (CRISTOFOLI, 2016).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO VINHO BRUTO E PERMEADO

Foram realizadas análises físico-químicas no vinho bruto e no vinho microfiltrado utilizando o equipamento WineScan Auto, FOSS, no Laboratório de Enoquímica da Vinícola Salton, de acordo com os parâmetros requisitados pelo MAPA (BRASIL, 1988).

O vinho bruto foi microfiltrado, e o permeado destinado às análises físico-químicas, coletado em intervalos de 1h30min e 3 h de processo. Os parâmetros analisados estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Métodos de análise físico-químicas realizadas no vinho antes e após MF.

PARÂMETRO	MÉTODO DE ANÁLISE
pH	Potenciométrico
Turbidez (NTU)	Determinada a partir de um turbidímetro
Densidade (kg/m ³)	Determinada por uma balança hidrostática
Açúcares totais (g/L)	Método Fehling, titulometria de oxirredução
Álcool %(v/v)	Destilação realizada em um destilador eletrônico automático
Acidez total (meq/L)	Método titulométrico acidimétrico
Acidez volátil (meq/L)	Destilação direta seguida de titulação

4.4 ANÁLISE DOS PESTICIDAS

As técnicas analíticas utilizadas para determinação dos pesticidas carbendazim e indoxacarbe no vinho foram a infusão direta em espectrometria de massas de alta resolução (DI-HRMS) e cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (HPLC-HRMS). Os materiais e procedimentos realizados em cada técnica são descritos a seguir.

4.4.1 Reagentes

Os padrões de carbendazim e indoxacarbe foram obtidos da Sigma Aldrich® e possuem pureza > 96%. Metanol (MeOH) grau HPLC foi adquirido pela Merck. Acetonitrila (ACN), ácido acético (CH₃COOH), ácido fórmico, acetato de sódio (CH₃COONa), amina secundária primária (PSA), formiato de amônio, sulfato de magnésio (MgSO₄), sílica modificada com hidrocarboneto linear, octadecilsilano (C18), todos com pureza ≥ 98% grau HPLC, foram obtidos da Sigma-Aldrich®.

4.4.2 Preparação das soluções de padrão de pesticidas

As soluções analíticas de cada padrão de pesticida foram preparadas individualmente na concentração de 1000 ppm em solução de metanol. Estas soluções foram armazenadas em frasco de vidro âmbar e estocadas em freezer para evitar a degradação do composto. Posteriormente, por diluições em metanol, foram feitas as soluções utilizadas para a fortificação das amostras de vinho utilizadas na MF e obtenção das curvas de calibração (CHIARELLO, 2018).

4.4.3 Microfiltração do vinho fortificado

O procedimento de fortificação das amostras de vinho submetido a MF consistiu em adicionar, de forma homogênea, à 400 mL de vinho bruto, isto é, que não contém os pesticidas em estudo, volumes da solução padrão de pesticida, de maneira a resultar nos níveis de concentração utilizados em cada técnica. Na infusão direta o vinho foi fortificado com 300 e 50 ppm de carbendazim. Na análise por HPLC-HRMS foi utilizada a concentração de 5000 ppb de ambos pesticidas para fortificação das amostras. O vinho foi microfiltrado durante 3 horas sob pressão de 3 bar.

4.4.4 Infusão Direta em Espectrometria de Massas de Alta Resolução (DI-HRMS)

As amostras microfiltradas fortificadas com carbendazim foram analisadas por infusão direta em um espectrômetro Bruker microTOF-QII com fonte de ionização *electrospray* (ESI). Amostras de padrões nas concentrações 300 e 50 ppm foram infundidas diretamente a $10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ no espectrômetro de massas utilizando como fonte de ionização ESI(+). A identificação dos compostos no vinho microfiltrado foi possível devido a utilização da espectrometria de massas de alta resolução, comparando as amostras com o padrão (CHIARELLO, 2018).

4.4.5 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HPLC-HRMS)

No preparo das amostras foi empregado o método de extração QuEChERS, após as amostras procederam em HPLC-HRMS para determinação dos pesticidas.

4.4.5.1 Procedimento de extração

Após testes preliminares, o método QUECHERS de Chiarello e Moura (2018) foi adaptado para a etapa de extração. A Figura 8 mostra as etapas realizadas.

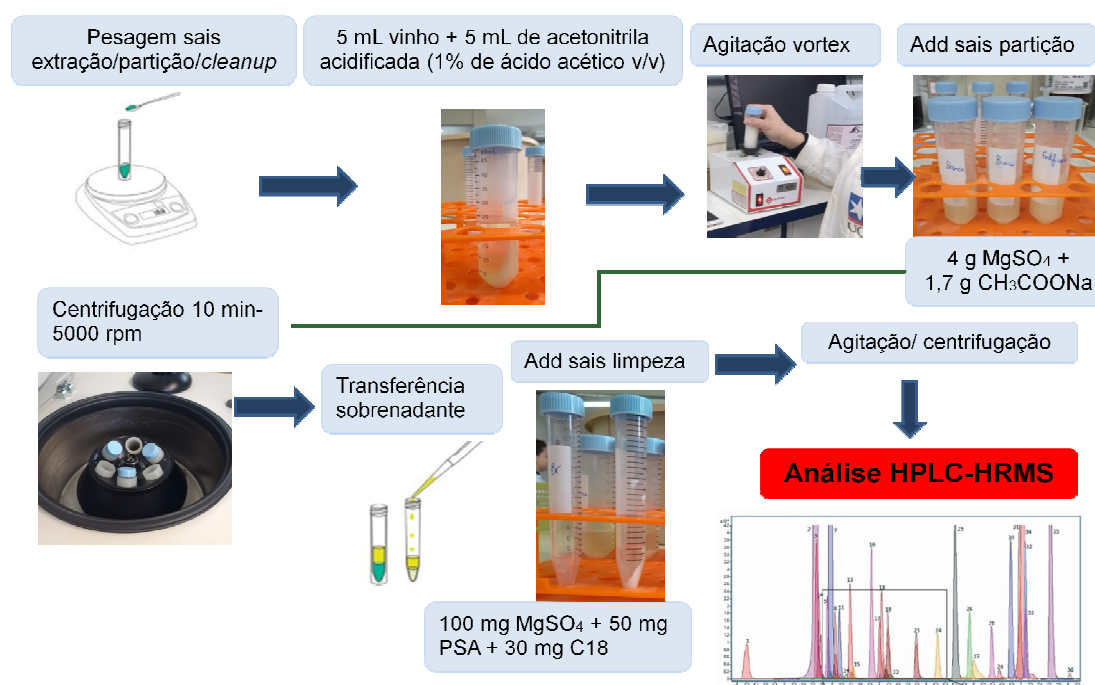


Figura 8. Metodologia aplicada no procedimento de extração.

Inicialmente, foram medidos 5 mL da amostra de vinho diretamente em tubos de centrífuga de polipropileno, com capacidade de 50 mL, seguidos da adição de 5 mL de acetonitrila acidificada (1% de ácido acético v/v). Cada tudo foi agitado por 1 min com o auxílio de um vortex e após foi realizada a adição dos sais de partição nas seguintes quantidades: 4 g MgSO₄ + 1,7 g CH₃COONa. O tubo foi agitado novamente em vortex e centrifugado por 10 min a 5000 rpm. O sobrenadante obtido após centrifugação foi retirado e transferido para um tubo falcon de 15 mL contendo 100 mg de MgSO₄ + 50 mg de PSA + 30 mg de C18. Os tubos foram agitados novamente por 1 min em vortex e

centrifugados a 5000 rpm durante 10 min. O extrato sobrenadante foi acondicionado em *vials* de 2 mL e injetados no sistema HPLC-HRMS (CHIARELLO *et al.*, 2018).

4.4.5.2 Análise instrumental

As determinações foram feitas empregando Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HPLC-HRMS). A fase móvel foi adaptada de Chiarello e Moura (2018). As análises foram realizadas utilizando o seguinte sistema de solventes: fase móvel (A) composta de água com 5 mmol·L⁻¹ de formiato de amônio e ácido fórmico 0,1% (v/v), e (B) metanol: água com 5 mmol·L⁻¹ de formiato de amônio e 0,1% ácido fórmico (90:10). O programa de gradiente iniciou com 25% de B, constante durante 1 min, seguido por um gradiente linear até 95% de B em 7,5 min, manteve-se constante durante mais 4,5 min, e depois com um gradiente linear 25% de B em mais 3 min, terminando em adicionais 3 min com 25% de B.

As amostras foram separadas empregando um sistema de Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (UPLC SHIMADZU) equipado com bomba LC-20ADXR, com amostrador automático SIL-20AXR, detector SPD-20 e forno CTO-20. Foi utilizada uma coluna analítica Eclipse XDB-C8 4,6 mm × 15 cm. O volume de injeção foi de 10 µL. Como detector foi utilizado um espectrômetro de massas com ionização por Electrospray (ESI) e separação por quadrupolo-tempo de voo (BRUKER, Q-TOFII). Seguem as principais condições do sistema de detecção: voltagem capilar de 4500 eV; fluxo do gás de nebulização (N₂): 3 L·min⁻¹; fluxo do gás de secagem (N₂): 15 L·min⁻¹; temperatura de interface: 200 °C. O sistema de ionização foi operado no modo positivo. Para obter as condições ótimas de análise de cada um dos pesticidas avaliados foram realizadas injeções diretas no espectrômetro de massas, com solução analítica padrão 0,5 mg·L⁻¹ de cada composto com energias de colisão de 10 a 30 eV (CHIARELLO *et al.*, 2018).

4.4.5.3 Validação do método cromatográfico

O desempenho do método foi avaliado por meio de determinação dos parâmetros de seletividade, linearidade e exatidão, de acordo com as normas ABNT (2005), ANVISA (2017), SANTE (2017) e INMETRO (2018).

No caso de utilização de detectores como o espectrômetro de massas, a seletividade já é garantida observando-se o tempo de retenção do analito e sua razão m/z . Assim, este parâmetro foi avaliado por comparação dos cromatogramas obtidos por injeções no sistema de HPLC-HRMS dos extratos das amostras “branco”, ou seja, ausente do composto de estudo e da amostra fortificada (SANTE, 2017).

A linearidade foi determinada a partir de curvas analíticas, onde foram gerados gráficos de calibração que relacionaram a resposta do equipamento em função das diferentes concentrações do analito. Com essa relação se produziu uma equação de regressão linear $y = ax + b$. Desta forma, foram determinadas soluções analíticas preparadas tanto em solvente quanto nos extratos da matriz, nas concentrações 1; 5; 10; 50; 100; 200 e 300 ppb. Também foi estimada a qualidade da curva analítica, calculando o coeficiente de correlação r^2 , uma vez que demonstra uma menor variação dos dados obtidos quanto mais próximo de 1 for o seu valor (CHIARELLO, 2018).

A exatidão do método foi determinada por meio de ensaios de fortificação e recuperação do método de extração. Para isso, foram preparadas amostras de vinho, e a essas foram adicionadas os padrões de carbendazim e indoxacarbe em diferentes níveis de concentração. Os testes de recuperação foram realizados em triplicata. Em geral, são aceitos intervalos de recuperação entre 70 e 120%, com precisão de até 20% para a maioria dos métodos analíticos, inclusive para análise de resíduos de agrotóxicos (SANTE, 2017). Para o cálculo da recuperação nos níveis de concentração utilizaram-se as áreas das amostras fortificadas e as áreas correspondentes aos padrões no mesmo nível de concentração, conforme Equação 1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

Neste item estão apresentados os resultados obtidos pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG), bem como os resultados obtidos nos testes de permeação, que compreendem os ensaios de compactação da membrana, permeabilidade hidráulica e permeabilidade do vinho.

5.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG)

A Figura 9a e 9b apresenta micrografias realizadas em diferentes membranas, onde é possível analisar a superfície, distribuição e tamanho de poros.

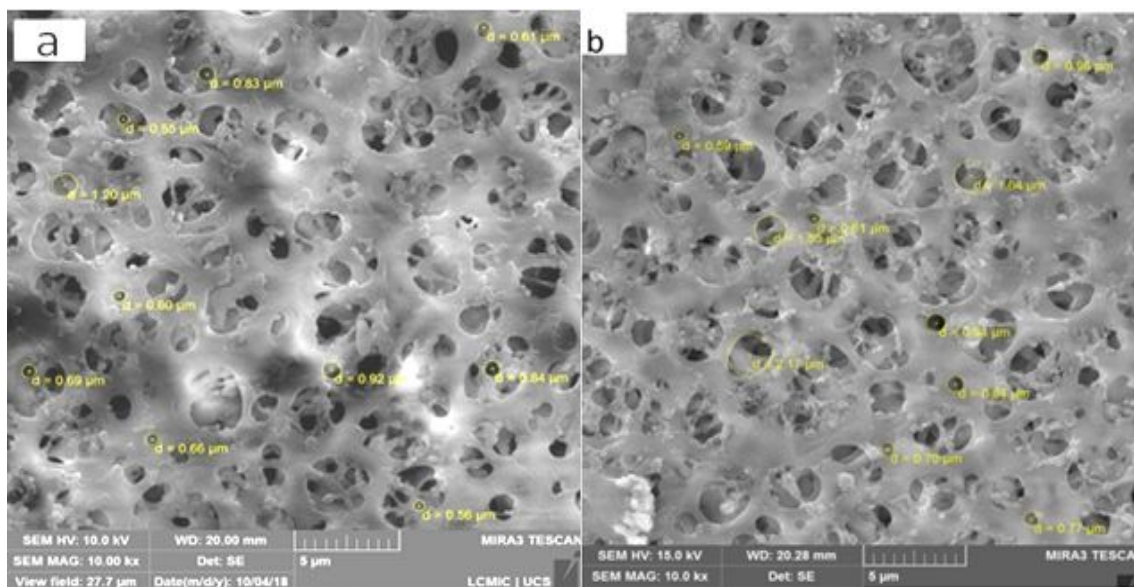


Figura 9. (a) e (b) Distribuição de tamanho de poro da membrana.

Como pode ser observado, ambas membranas apresentaram uma camada porosa em sua superfície. O tamanho dos poros variou com diâmetros na faixa entre 0,55 a 2,17 μm , sendo esta faixa de tamanho de poros característico de membranas de MF, cujo diâmetro médio dos poros está no intervalo de 0,1 a 10 μm (HABERT *et al.*, 2006). Conforme Trevisoli (2010), não é comum a existência de membranas com diâmetros de poros únicos, e sim, com certa distribuição em torno de um diâmetro médio. A Figura 10a e 10b apresenta as micrografias da secção transversal da membrana.

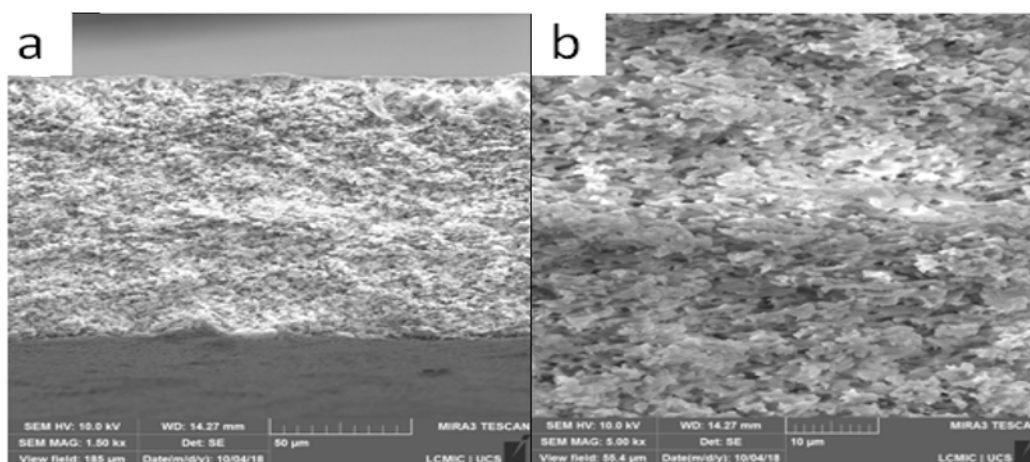


Figura 10. Micrografia da secção transversal da membrana em (a) escala 50 μ m e (b) 10 μ m

De acordo com a morfologia observada, esta membrana é classificada como uma membrana porosa simétrica isotrópica, pois apresenta as mesmas características morfológicas ao longo de sua espessura (HABERT *et al.*, 2006).

A superfície das membranas antes e após ensaio com água destilada também foi avaliada, como é apresentado na Figura 11a e 11b, respectivamente.

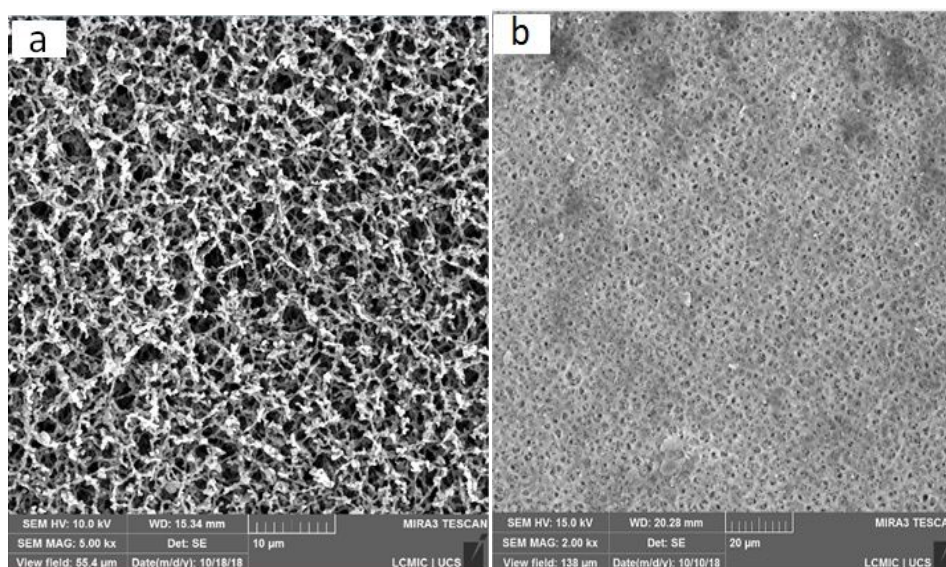


Figura 11. Micrografias da membrana no MEV - a) antes da MF e b) após MF

A diferença da superfície das membranas pode estar relacionada a compactação e hidratação das fibras após a MF com água destilada, onde é possível verificar o adensamento na microestrutura da membrana. Este fato explica o decaimento do fluxo de permeado logo após o início da MF, mesmo quando a membrana já foi compactada com água (CRISTOFOLI,2016). Estas alterações de fluxo podem estar associadas à

deformação mecânica (compactação) das membranas e inchamento da matriz polimérica devido a interações físico-químicas com a água (HABERT *et al.*, 2006).

5.1.2 Testes de permeação

A Figura 12 apresenta o gráfico de fluxo de permeado por tempo da etapa de compactação a 3 bar. Esta pressão foi utilizada nos ensaios, pois conforme Habert *et al.* (2006), as pressões empregadas em MF como força motriz para o transporte não ultrapassam 3 bar.

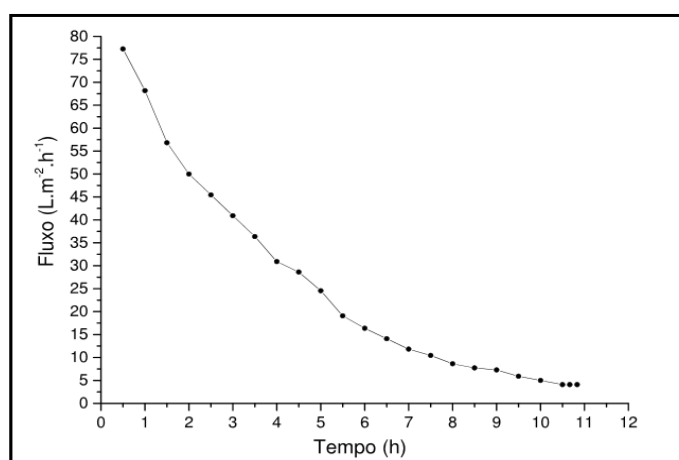


Figura 12. Determinação da compactação das membranas.

O comportamento do fluxo de permeado no início do ensaio se apresentou elevado, decrescendo ao longo do período de ensaio, até a obtenção de fluxo permeado constante. Estes resultados confirmam o que foi demonstrado anteriormente pelas micrografias MEV-FEG, que apresentaram a morfologia da membrana antes e após MF, onde é possível visualizar esta compactação.

A compactação da membrana se torna necessária, uma vez que, quando aplicada uma dada pressão sobre a membrana pode ocorrer adensamento da microestrutura da mesma causando o decréscimo do fluxo de água com o tempo. Desta forma, uma avaliação das características de compactação da membrana pode evitar erros de interpretação dos experimentos, pois a compactação pode ser confundida com outros fenômenos de redução de fluxo, como o *fouling* ou a polarização por concentração (CRISTOFOLI, 2016).

5.1.2.1 Permeabilidade Hidráulica

A permeabilidade hidráulica é um parâmetro muito importante para caracterização da membrana e referência para análise do seu comportamento em processos de separação com utilização de outras soluções (ZANINI *et al.*, 2017). Relacionada com o fluxo do permeado de água destilada em diferentes pressões, a Figura 13 mostra os resultados obtidos e sua representação gráfica.

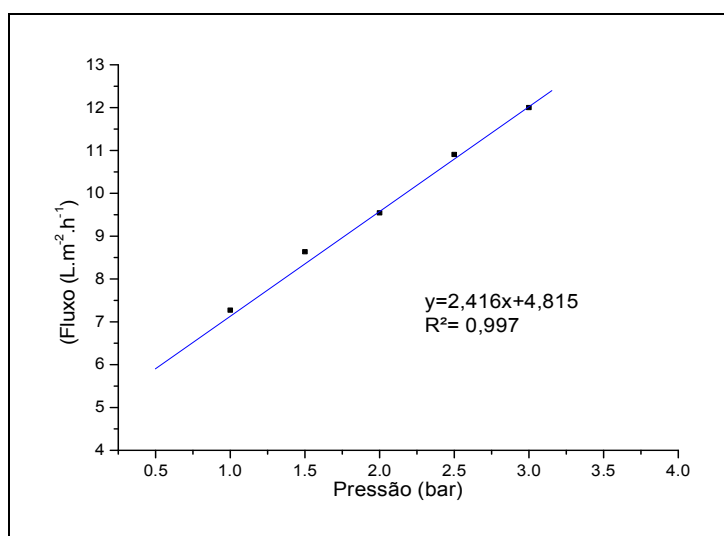


Figura 13. Permeabilidade hidráulica das membranas testadas em diferentes pressões.

Observa-se que o fluxo de água aumenta linearmente em relação a pressão aplicada, podendo ser representada por uma função linear. O aumento da pressão transmembrana proporciona aumento no fluxo de permeado devido a força motriz (ZANINI *et al.*, 2017). A permeabilidade hidráulica foi calculada pelo coeficiente angular da curva entre o fluxo permeado em função da pressão transmembrana, de acordo com a Equação 2, obtendo-se valor de $2,4 \text{ L}\cdot\text{m}^{-2}\text{h}^{-1}\text{bar}^{-1}$.

5.1.2.2 Testes de permeação do vinho

Os fluxos obtidos durante o ensaio de permeabilidade do vinho branco em diferentes pressões transmembrana estão apresentados na Figura 14.

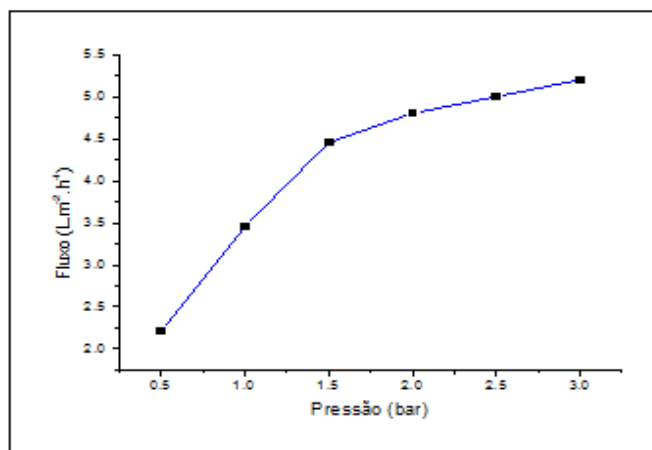


Figura 14. Fluxo de permeado do vinho em diferentes pressões.

Observa-se que o fluxo de vinho permeado é proporcional a pressão aplicada, no entanto, as curvas não possuem a mesma linearidade que o fluxo hidráulico. Este comportamento pode ser atribuído a quantidade de soluto presente no vinho, que chega a superfície da membrana, intensificando os fenômenos de polarização por concentração e incrustação. Eles ocorrem gradativamente durante o processo de MF impactando na vazão do fluxo permeado, favorecendo o estado estacionário (fluxo constante), conhecido como *fouling* [CRISTOFOLI, (2016); MACHADO *et al.*, (2012)].

Os principais fatores associados a redução do fluxo são a obstrução dos poros, deposição de sólidos e interação química entre o material da membrana e os componentes coloidais do vinho (PALACIOS *et al.*, 2002). Nesta matriz complexa podem estar inclusas moléculas de soluto (ácidos orgânicos, sais, polifenóis), colóides e partículas como leveduras, bactérias lácticas, precipitados orgânicos e partículas grandes, como restos celulares e cristais de tartarato de potássio e hidrogênio (PINTO *et al.*, 2008).

O aumento da pressão transmembrana de 0,5 a 1,5 bar, promoveu aumento mais expressivo de fluxo de permeado. Podendo ser considerado como sendo o fluxo limite, ou seja, quando à medida que a pressão do sistema aumenta, o fluxo de permeado deixa de ser linear tendendo a se estabilizar. Porém, o fluxo de permeado não deixou de aumentar com o aumento da pressão. Nas demais pressões verificou-se tendência a um aumento de fluxo de permeado mais constante. A pressão de 3 bar foi adotada nos ensaios de MF, pois forneceu um fluxo maior de permeado do que as demais pressões, sendo coletado o volume necessário para posterior análise de pesticidas.

Comportamento similar a este foi encontrado por Palacios *et al.* (2002), quando analisaram a microfiltração tangencial de vinho do tipo xerez com membranas de PVDF

de $0,45 \mu\text{m}$. Foi observado que o fluxo de vinho permeado possuía uma relação linear até determinada pressão transmembrana, chamada pressão transmembrana ótima, acima deste valor o fluxo tornava-se independente da pressão.

A Figura 15 apresenta o fluxo de permeado de vinho branco em função do tempo.

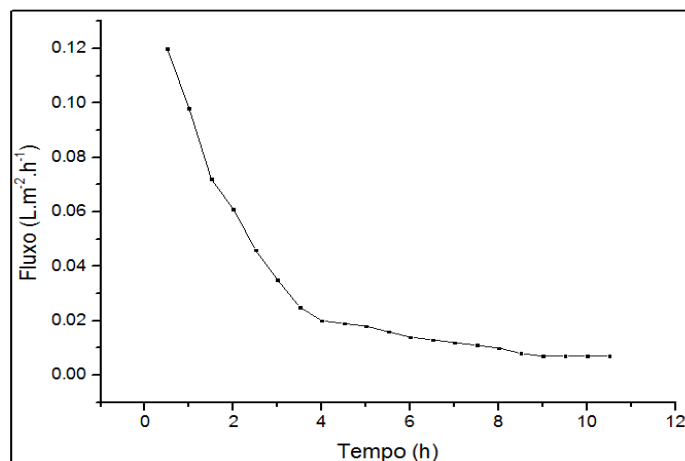


Figura 15. Fluxo de permeado de vinho branco em função do tempo.

Como se pode observar, o declínio de fluxo de permeado do vinho em função do tempo teve efeito mais pronunciado no período inicial da pressurização. Depois de algum tempo, o fluxo de permeado através da membrana tende a ter uma menor variação, corroborando com os resultados obtidos anteriormente. Vinhos brancos podem diminuir o fluxo de permeado em aproximadamente 60% durante o processo de MF (BURGGRAAF & COT, 1996). Gonçalves *et al.* (2001), trabalhando com sistema de MF com membrana polimérica de $1,0 \mu\text{m}$, obtiveram valores de fluxo de permeado reduzidos a 35% ao final do processo, com sistema operando a 1 bar.

5.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO VINHO

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos relacionados à caracterização do vinho antes e após o processo de MF.

Tabela 8. Resultados analíticos do vinho bruto e vinho permeado.

Vinho	Densidade Relativa	Álcool (%v/v)	Açúcares (g·L ⁻¹)	pH	Acidez total (meq·L ⁻¹)	Acidez volátil (meq·L ⁻¹)	Turbidez (NTU)
Bruto	0,9930	10,48	2,13	3,13	105,54	4,15	3,6
P 1h30min*	0,9935	10,33	2,09	3,12	105,84	4,17	1,25
P 3h*	0,9935	10,30	1,98	3,12	105,84	4,17	0,94
Padrão**	-	10 - 13	0 - 4	-	55-130	0-20	< 1,0

*P 1:30/ 3h - Permeado 1:30 e 3 h; **Padrões de identidade e qualidade do vinho, estabelecidos pelo MAPA, Portaria N° 229, de 25 de outubro de 1988.

A concentração de álcool apresentou mínima redução após a MF. Para o vinho permeado através da membrana após 3 horas o valor de álcool obtido foi de 10,30% (v/v) enquanto que o vinho bruto apresentou concentração de 10,48% (v/v). A legislação brasileira, por meio da Portaria N.º 229, de 25 de outubro de 1988, prevê um intervalo de álcool de 10,0 a 13,0% (v/v) para este parâmetro. Processos de MF de vinho em escala industrial, com membrana polimérica, tem apresentado uma redução de até 0,20% (v/v) na concentração de álcool em relação ao vinho bruto (CRISTOFOLI, 2016).

Os parâmetros densidade, açúcar, pH, acidez total e acidez volátil não apresentaram variação relevante após a MF. Com exceção da turbidez, os demais itens mostraram-se constantes ao longo do processo.

Quanto a turbidez, após 3h de MF do vinho, obteve-se um permeado com esta característica dentro do padrão estabelecido pelo MAPA, ou seja, inferior a 1,0 NTU.

Urkiaga *et al.* (2002), obtiveram valores de turbidez de 0,25 e 1,23 NTU, utilizando membranas de acetato de celulose com 0,45 µm de diferentes fornecedores, partindo de um vinho com turbidez inicial de 3,65 NTU, o que confere uma redução de até 93%. Ribereau-Gayon *et al.* (2003), observaram a redução de 8% na concentração de taninos em vinho branco após filtração em membrana polimérica de 0,65µm. Seguenka *et al.* (2014), analisaram a micro e ultrafiltração na clarificação de vinho, e suas características físico-químicas após os tipos de filtração. De acordo com os autores, a turbidez, assim como demais características físico-químicas do vinho, obtiveram reduções gradativas de acordo com o tamanho dos poros das membranas.

5.3 ANÁLISE DE PESTICIDAS

5.3.1 Infusão direta em Espectrometria de Massas de alta resolução (DI-HRMS)

A utilização da espectrometria de massas de alta resolução possibilitou a detecção do íon molecular (carbendazim- H^+ com $m/z = 192,0773$) com alta resolução (4 casas decimais). A Figura 16a e 16b apresenta o cromatograma obtido para o vinho fortificado com 300 ppm e o pico obtido para o vinho fortificado após a MF com membranas poliméricas.

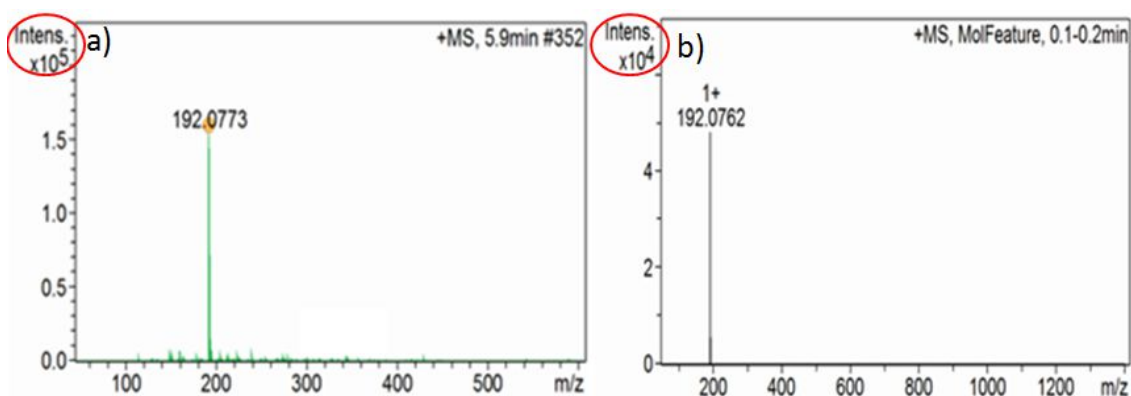


Figura 16. Espectro do carbendazim a) 300 ppm padrão e b) após MF.

A seguir, na Figura 17, é apresentada a variação da intensidade dos picos do carbendazim no vinho fortificado em uma concentração de 50 ppm utilizada como padrão e após a MF.

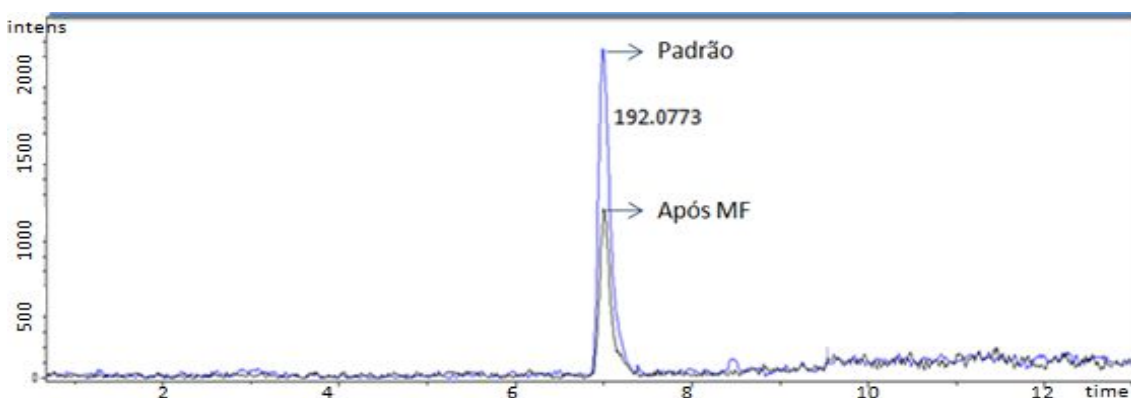


Figura 17. Cromatograma do íon selecionado carbendazim (concentração 50 ppm) padrão e após MF

A intensidade dos picos representa a concentração de carbendazim na amostra, e se observa o mesmo comportamento em ambas concentrações. O vinho fortificado após

a MF apresentou menor concentração de carbendazim, sendo assim, considera-se que a membrana polimérica apresentou potencial de retenção do pesticida no vinho. Os resultados da MF do presente trabalho podem ser comparados com os de Doulia *et al.*, (2016), onde membranas de acetato de celulose foram mais efetivas na remoção de diferentes pesticidas.

Para justificar o comportamento da membrana na retenção de pesticida no vinho, pode-se correlacionar as propriedades dos pesticidas (principalmente log Kow e solubilidade em água), sua estrutura molecular, bem como o tipo de membrana utilizada. Doulia *et al.* (2016), observaram que membranas de acetato de celulose de MF mostraram maior eficiência na remoção dos pesticidas mais hidrofóbicos (log Kow > 4,5), de maior massa molar (>395 g/mol) e de baixa solubilidade em água (0,027-1.4 mg·L⁻¹) presentes em vinhos (DOULIA *et al.*, 2016). Conforme Pereira (2018), o coeficiente Kow está relacionado com a hidrofobicidade do composto, sendo que substâncias com log Kow menor que 2,5 apresentam característica hidrofílica, tendo maior afinidade com a água e baixa tendência em se associar à fração sólida hidrofóbica, neste caso a membrana polimérica. O carbendazim apresentou resultados medianos de retenção, porém válidos, devido às suas propriedades de menor log Kow (log Kow 1,5), alta solubilidade em água (8 mg·L⁻¹) e baixa massa molecular. Portanto, tem baixa tendência a se associar à fração sólida hidrofóbica, ou seja, tais compostos podem ser considerados bastante hidrofílicos e com capacidade de difusão em meio aquoso (DOULIA *et al.*, 2016).

5.3.2 Cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (HPLC-HRMS)

A Tabela 9 apresenta as concentrações das amostras de vinho fortificadas com 5000 ppb de carbendazim e indoxacarbe submetidas à MF por 3h. Posteriormente alíquotas foram coletadas e diluídas na proporção 1:9 (v/v), em MeOH, para serem injetadas e avaliadas por HPLC-HRMS.

Tabela 9. Concentração de pesticida após MF

Pesticidas	Concentração média (ppb)	Retenção (%)
Padrão	5000	-
Carbendazim	2733	46
Indoxacarbe	1750	65

A quantificação foi baseada na comparação da área do pico da amostra em uma curva de regressão linear derivada do padrão controle. As concentrações do analito nas amostras do vinho fortificado após MF, o que corresponde às áreas obtidas nos ensaios, apresentaram valor médio de 2733 ppb para o carbendazim e 1750 ppb para o indoxacarbe. Partindo de uma concentração inicial de 5000 ppb adotada para fortificar o vinho, considera-se portanto a retenção de 46% de carbendazim e 65% de indoxacarbe pela membrana polimérica.

Nesta análise pode-se mencionar o mecanismo de remoção de pesticidas em vinhos apresentado na seção sobre DI-HRMS. Quanto mais hidrofóbico for o pesticida, maior será a sua remoção pela membrana. É relatada a tendência de moléculas hidrofóbicas serem expulsas de uma solução aquosa em direção a um substrato sólido orgânico, que é termodinamicamente favorecido, em favor de reduzir a energia livre do sistema. Também devem consideradas interações desenvolvidas diretamente ou indiretamente entre a superfície da membrana e os pesticidas presentes na solução ácida do vinho. Podem ser citados mecanismos que podem influenciar a reação, incluindo forças de van der Waals (dependendo da estrutura molecular e massa do pesticida), interações hidrofóbicas, interações polares (ligação de hidrogênio) (DOULIA *et al.*, 2016; DOULIA *et al.*, 2017).

A discussão quanto aos resultados obtidos de remoção de pesticida em ambas análises desenvolvidas, apresenta dificuldade de especificação devido ao grande número de compostos (variando em estrutura, tamanho, polaridade, capacidade de ligação, etc.) presentes nos vinhos em combinação com a variedade de pesticidas adicionados e a geração de diversos metabólitos de reação (DOULIA *et al.*, 2016; DOULIA *et al.*, 2017; RUOCCO *et al.*, 2019).

A membrana de acetato de celulose examinada possui na sua estrutura éster de celulose conectada com uma série de grupos hidrofílicos (-OH). As moléculas do pesticida carbendazim incluem cadeias hidrofóbicas de hidrocarbonetos, grupos hidrofílicos, anéis aromáticos e heteroátomos que aparecem como sítios aceptores de ligação de hidrogênio. Esses sítios polares podem atuar nas interações hidrofílicas/hidrofóbicas e de adsorção dos pesticidas na membrana.

Além disso, a variedade de compostos de vinho (polissacarídeos, proteínas, compostos polifenólicos, fenólicos, ácidos, flavonóides, antocianinas, taninos, etc.) (RUOCCO *et al.*, 2019) poderia desenvolver ou afetar interações com pesticidas e / ou

com membranas que melhoram ou reduzem a remoção de pesticidas. A solução ácida dos vinhos certamente afetará o resultado final de remoção de pesticidas e K_{ows} de pesticidas e outros compostos devem ser examinados (DOULIA *et al.*, 2016).

Kyriakopoulos *et al.* (2006), relataram este mesmo mecanismo quando analisaram a adsorção de pesticidas por resinas poliméricas visando o tratamento de água. As resinas utilizadas foram de poliestireno e éster poliacrílico. Os pesticidas examinados foram alachlor, trifluralina e prometryn. O efeito das forças iônicas na adsorção dos pesticidas foi investigado. Os autores apresentam que a adsorção pelas resinas é afetada pela estrutura do pesticida, o qual determina o tipo de interação desenvolvida entre interface resina/ pesticida. Este efeito se mostrou mais pronunciado para as moléculas mais polares (alachlor e prometryn) comparado a adsorção com trifluralina. O mecanismo de adsorção inclui interações polares e hidrofóbicas. As interações hidrofóbicas para os pesticidas testados mostram que alachlor > prometryn > trifluralina, porque suas moléculas contém 14,13 e 10 átomos, respectivamente. A solubilidade em água dos pesticidas também foi levada em conta: Alachlor ($140 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) > prometryn ($33 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) > (trifluralina $0,184 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

De acordo com os mecanismos revisados na literatura anterior, testes com o indoxacarbe, por exemplo, poderiam oferecer resultados de maior remoção de pesticida no vinho, em comparação ao carbendazim que pode ser avaliado. O indoxacarbe possui características mais hidrofóbicas, maior massa molecular e menor solubilidade do que o carbendazim (Tabelas 2 e 3), o que sugere uma maior adsorção pela membrana de AC.

5.3.2.1 Validação Analítica

Para a validação do método cromatográfico foram avaliadas a linearidade da curva analítica, seletividade e exatidão a partir dos ensaios de recuperação em diferentes níveis de concentração. Ambos pesticidas puderam ser analisados.

5.3.2.1.1 Seletividade

A partir dos resultados dos cromatogramas das Figuras 18 e 19, não foi detectada a presença de possíveis interferentes, compostos de produtos da degradação ou outras substâncias que possam estar presentes na matriz e que possam comprometer

a quantificação dos analitos, ou seja, não foram detectados interferentes (sinal, pico, traços de íons) que poderiam eluir na região de interesse.

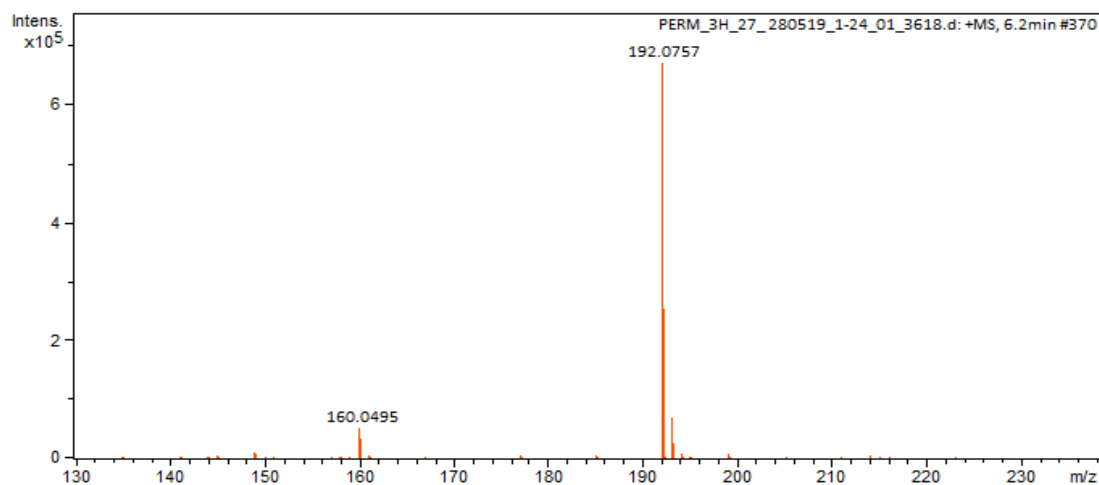


Figura 18. Cromatograma do íon carbendazim (m/z íon precursor = 192,0757; íon produto= 160,0495).

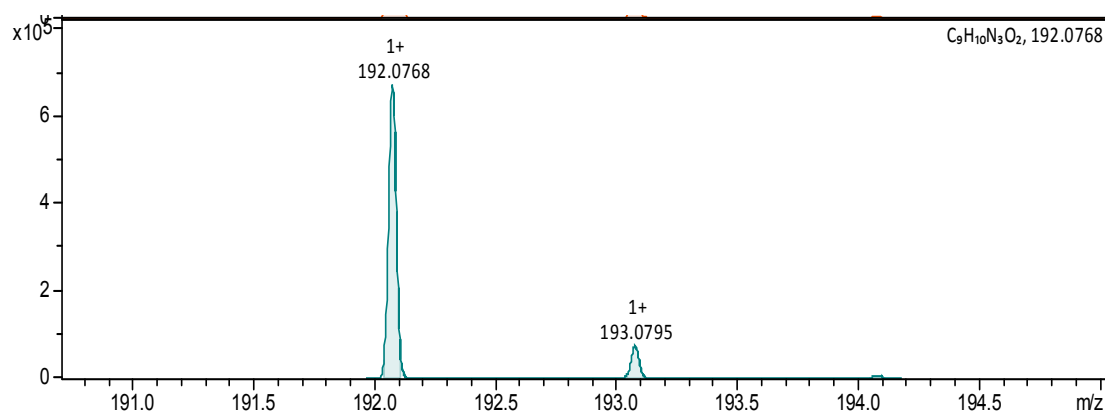


Figura 19. Cromatograma do íon carbendazim (m/z íon precursor = 192,0768; íon produto= 193,0795).

A identificação do carbendazim foi confirmada pela presença das transições iônicas fornecidas pelo seu íon precursor e a razão isotópica. Estes resultados foram observados por Oshita *et al.* (2015), e Reichert *et al.* (2015), que utilizaram a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para determinação de carbendazim em diferentes matrizes de alimentos.

5.3.2.1.2 Curva de calibração e linearidade

A linearidade foi obtida a partir da curva-padrão do pesticida, em 7 níveis de concentração (1-300 ppb), testados em triplicata. A Figura 20 apresenta a curva analítica correspondente aos testes realizados.

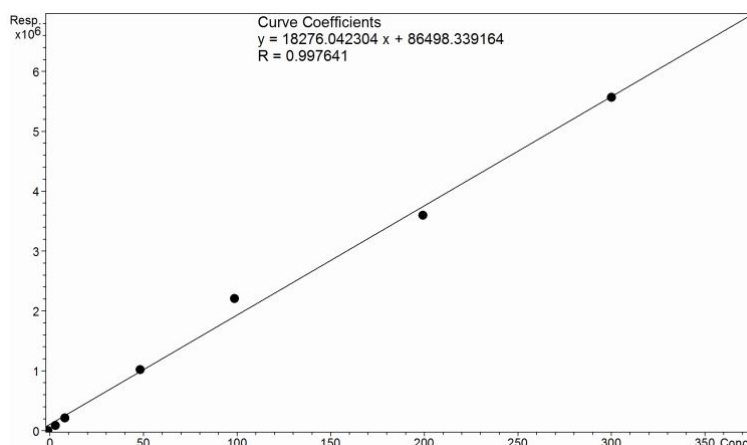


Figura 20. Curva analítica do composto carbendazim.

A partir dos dados obtidos para a construção das curvas analíticas e análise das equações das retas no HPLC-HRMS foi possível verificar que o modelo de regressão linear com adição de padrão na matriz analisada foi adequado para as determinações analíticas em estudo. Obteve-se coeficientes de correlação de no mínimo 0,99. Desta forma, a correlação está de acordo com as orientações da ANVISA (2017) que recomenda r^2 igual a 0,99 e do INMETRO (2018) que recomenda r^2 acima de 0,90. O pesticida analisado apresentou faixa linear entre 1,0 a 300 ppb.

5.3.2.1.3 Exatidão

A exatidão foi estimada por meio de ensaios de recuperação, no qual amostras de vinho foram fortificadas com carbendazim e indoxacarbe, em níveis de concentração distintos, e estas foram submetidas a todo o procedimento de extração e preparo para análise (Figura 21). As recuperações médias obtidas das triplicatas são destacadas na Tabela 10.

Tabela 10. Índice de recuperação do procedimento de extração

Nível de fortificação (ppb)	Recuperação média (%)	
	Carbendazim	Indoxacarbe
10	73,32%	27,62%
50	65,98%	62,10%
100	105,95%	102,9%
300	85,93%	63,19%



Figura 21. Etapas do ensaio de validação do método

Em geral, são aceitos intervalos de recuperação entre 70 e 120% (SANTE, 2017), porém, para amostras muito complexas do ponto de vista analítico ou mesmo do ponto de vista de matriz, pode-se aceitar valores de 50 a 120% (RIBANI *et al.*, 2004). Os resultados obtidos indicam que a eficiência do procedimento de extração utilizado obteve valores considerados satisfatórios do ponto de vista analítico, conforme as normas de validação de métodos analíticos mencionadas.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nas análises realizadas para detecção de pesticidas no vinho branco, pode-se considerar que a MF com membrana polimérica de acetato de celulose apresenta potencial de retenção de pesticidas.

Tanto na infusão direta, quanto na análise cromatográfica, a intensidade dos picos obtidos para o carbendazim presente no vinho fortificado após MF são menores que a intensidade máxima (vinho fortificado padrão).

O uso da MF preserva a qualidade do vinho, pois não apresenta alterações em suas características físico-químicas após o processo.

A partir da análise dos parâmetros avaliados na validação do método analítico, pode-se dizer que os resultados obtidos podem ser considerados confiáveis do ponto de vista analítico.

A utilização de membranas poliméricas de MF se apresenta como uma alternativa promissora na remoção de resíduos de pesticidas que possam estar presentes em vinhos, tendo em vista assegurar a saúde dos consumidores e a qualidade final do produto.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Utilizar como matriz, o vinho rose ou tinto.
- Explorar membranas de outros materiais poliméricos.
- Realizar modificações nas superfícies das membranas para avaliar a sua capacidade de remoção de pesticidas no vinho.
- Testar outros pesticidas detectados na uva.
- Avaliar a utilização dos demais PSM com o mesmo objetivo deste trabalho.

REFERÊNCIAS

ABNT. Associação brasileira de normas técnicas. **NBR 14029**: validação de métodos analíticos voltada a agrotóxicos e afins. Brasil, 2005.

ALMANÇA, M. A. K.; LERIN, S.; CAVALCANTI, F. R. Doenças da videira. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 36, n. 289, p.70-80, 2015.

ALVES, A. A. R., RODRIGUES, A. S., BARROS, A. B. P., UEKANE, T. M., BIZZO, H. R., REZENDE, C. M. Determination of Pesticides Residues in Brazilian Grape Juices Using GC-MS-SIM. **Food Analytical Methods**, v.7, p.1834–1839, 2014.

ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S. J., STAJNBAHER, D., SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticides in produce. **Journal of AOAC International**, v.86, p.412–431, 2003.

ANGIONI, A.; DEDOLA, F.; GARAU, V.L.; SCHIRRA, M.; CABONI, P. Fate of iprovalicarb, indoxacarb, and boscalid residues in grapes and wine by GC-ITMS analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.6806–6812, 2011.

ANVISA. Índice monográfico indoxacarbe. Disponível em: <file:///H:/artigos/trabalhos2019/Indoxacarbe%20anvisa.pdf>. Acesso em JAN 2020. 2019.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>. Acesso em JAN 2020. 2020a.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anvisa inicia a reavaliação do carbendazim. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias//asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-inicia-a-reavaliacao-do-carbendazim/219201/pop_up?inheritRedirect=false. Acesso em: JAN 2020. 2020b.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Carbendazim reunião site.pdf. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Carbendazim+reuniao+site.pdf/42e06681-9b0f-461a-bc6d-2f9dd6a93875> . Acesso em JAN 2020. Publicado em 28 de mar de 2018.

ANVISA. **Resolução RDC 166, de 25 de Julho de 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Ministério da Saúde, Brasil, v. 2017, p. 1–21, 2017.

APVMA. Australian Pesticide and Veterinary Medicines Authority. Carbendazim – Review Findings Report. The reconsideration of the active constituent carbendazim, registration of products containing carbendazim and approvals of their associated labels. Agosto 2012.

BORDIN, A. B., MINETTO, L., FILHO, I. N., BEAL, L. L., MOURA, S. Determination of Pesticide Residues in 405 Whole Wheat Flour Using Modified QuEChERS and LC–MS/MS. **Food Analytical Methods**, v. 10, p.1–9, 2017.

BURGGRAAF, A.J.; COT, L. **Fundamentals of inorganic membrane science and technology**. 4ª Ed. Elsevier Science Publishers, 1996.

BRUCH, Kelly Lissandra. Nem tudo que tem uva é vinho. Bento Gonçalves: **IBRAVIN**, 2012.

CALHELHA, R.C.; ANDRADE, J.C.; FERREIRA, I.C.; ESTEVINHO, L.C. Toxicity effects of fungicide residues on the wine-producing process. **Food Microbiology**, v.23, p. 393–398, 2006.

CHEN, X. Multiclass mycotoxin analysis in wine and its raw materials by ultra highperformance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a procedure based on QuEChERS.

CHEREMISINOFF, N. Liquid filtration. **Butterworth- Heinemann**, 1998. 319 p.

CHIARELLO, M. Determinação de resíduos de pesticidas em alimentos por cromatografia a líquido acoplada a analisadores de espectrometria de massas. 2018. 197 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2018.

CHIARELLO, M.; GRAEFF, R.N.; MINETTO, L.; CEMIN, G.; SCHNEIDER, V.E.; MOURA, S. Determinação de agrotóxicos na água e sedimentos por HPLC-HRMS e sua relação com o uso e ocupação do solo. **Química Nova**, v. 40, p. 158-165, 2017.

CHIARELLO, M.; MOURA, S. Multi-pesticide residue analysis by high resolution mass spectrometry in complementary matrices: wheat flour, lettuce and apple samples. **Journal of Analytical Methods**, v. 10, p. 3958-3967, 2018.

CODEX Alimentarius International Food Standards. **Codex maximum residue limits for pesticides**. Disponível em: <http://www.fao.org/waicent/faostat/Pest-Residue/pest-e.htm>. Acesso em JAN 2020.

CRISTOFOLI, K. Clarificação de vinho branco por microfiltração utilizando diferentes membranas cerâmicas e compósitas. 2016. 121f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência dos Materiais) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2016.

DOULIA, D.S.; ANAGNOS, E.K.; LIAPIS, K.S.; KLIMENTZOS, D.A. Removal of pesticides from white and red wines by microfiltration. **Journal of Hazardous Materials**, v.317, p.135-146, 2016.

EFSA. European Food Safety Authority. Conclusion on Pesticide Peer Review. Conclusion on the Peer Review of th Pesticide Risk Assessment of the Active Substance Carbendazim. *EFSA Journal*, 8(5):1598. 2010.

EL RAYESS, Y.; ALBASI, C.; BACCHIN, P.; TAILLANDIER, P.; RAYNAL, J. ; PEUCHOT, M.M.; DEVATINE, A. Cross-flow microfiltration applied to enology: A review. **Journal of Membrane Science**, v.382, p.1-19, 2011.

FLANZY, C. **Enologia: Fundamentos Científicos y Tecnológicos**. 2ª Edição, AMV. Ediciones; Ediciones Mundi Prensa. Madrid, 2003.

FIELD, R.W.; WU, D.; HOWELL, J.A.; GUPTA, B.B. Critical flux concept for microfiltration fouling. **Journal of Membrane Science**, v.100, p. 259-272, 1995.

GONÇALVES, F.; FERNANDES, C.; PINHO, M.N. White wine clarification by micro/ultrafiltration: effect of removed colloids in tartaric stability. **Separation and Purification Technology**. v.22-23, p. 423-429, 2001.

GUILFORD, J. M.; PEZZUTO, J. M. Wine and health: a review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 62, n. 4, p. 471-486, 2011.

HABERT, A. C.; BORGES, C.P.; NÓBREGA, R. **Processos de separação com membranas**. E-papers. Rio de Janeiro, 2006.

HAN, S. Y.; LI, M. Safety risk and its control of wine. **Journal of Food Science and Technology**, v.34, p. 12–17, 2016.

HAN, Y.; SONG, L.; ZHAO, P.; LI, Y.; ZOU, N.; QIN, Y.; LI, X.; PAN, C. Residue determination of glufosinate in plant origin foods using modified Quick Polar Pesticides (QuPPE) method and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 197, p. 730–736, 2016.

HE, J.; ZHANG, B.; ZHANG, H.; HAO, L-L.; MA, T-Z.; WANG, J.; HAN. S-Y. Monitoring of 49 Pesticides and 17 Mycotoxins in Wine by QuEChERS and UHPLC–MS/MS Analysis. **Journal of Food Science**, v.84, p. 2688, 2019.

IBRAVIN- Instituto Brasileiro do Vinho. Disponível em: <https://www.ibravin.org.br/>. Acesso em: JAN 2020.

INMETRO. Instituto nacional de metrologia, normalização e qualidade industrial. Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008 Revisão 07. Disponível em: https://sogi8.sogi.com.br/Arquivo/Modulo113.MRID109/Registro1295900/DOQ-Cgcre-8_07.pdf. Acesso em JAN 2020. 2018

KYRIAKOPOULOS, G.; XIARCHOS,I.; DOULIA,D. Treatment of contaminated water with pesticides via adsorption. **Journal of Environmental Technology and Management**, v. 6, No. 5, p.515–524, 2006.

KILJANEK, T., NIEWIADOWSKA, A., GAWEŁ, M., SEMENIUK, S., BORZEĆKA, M., POSYNIK, A., POHORECKA, K. Multiple pesticide residues in live and poisoned honeybees – Preliminary exposure assessment. **Chemosphere**, v.175, p.36–44, 2017.

LIANG, W., WANG, J., ZANG, X., DONG, W., WANG, C., WANG, Z. Barley husk carbon as the fiber coating for the solid-phase microextraction of twelve pesticides in vegetables prior to gas chromatography–mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, 31(1491), 9-15, 2017.

LIU, X., LIU, C., WANG, P., YAO, G., LIU, D., ZHOU, Z. Effervescence assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on cohesive floating organic drop for the determination of herbicides and fungicides in water and grape juice. **Food Chemistry**, 245, 653–658, 2018.

LÓPEZ-GUTIÉRREZ, N., ROMERO-GONZÁLEZ, R., FRENICH, A.G. Determination of polyphenols in grape-based nutraceutical products using high resolution mass spectrometry, **LWT - Food Science and Technology** (2016), doi: 10.1016/j.lwt.2016.03.037.

MACHADO, R. M. D.; HANEDA, R. N.; TREVISAN, B. P. & FONTES, S. R.. Effect of enzymatic treatment on the cross-flow microfiltration of açaí pulp: Analysis of the fouling and recovery of phytochemicals. **Journal of Food Engineering**, 113, 442–452, 2012.

MACHADO, P.L., GUEDES, F.F. Avaliação do conteúdo de trans-resveratrol em vinhos elaborados a partir das variedades de uva bordô e isabel. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, v.13, p.103-115, 2015.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria N° 43, de 18 de maio de 2016**. Complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho e derivados da uva e do vinho e derivados da uva e definem a classificação das variedades de uvas. 2016.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria N° 267, de 11 de dezembro de 2019**. Publica os resultados do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes- PNCRC, no 2º semestre de 2015 (2015.2), 2016, 2017 e 2018. 2019.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria N° 229, de 25 de outubro de 1988**. Aprova as normas referentes à complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho.

MPF. Ministério Público Federal- Procuradoria Federal dos Direitos do Cidadão (PFDC). Agrotóxicos: subsídios para a análise das medidas de fiscalização. **PGR-00570874/2019**. Disponível em: <http://www.mpf.mp.br/pfdc/manifestacoes-pfdc/anexo-ao-oficio-470-2019-pfdc-mpf>. Brasília, 17 de dezembro de 2019. Acesso em: JAN 2020.

MORAES, R.F. de. Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada- Ipea**, 1990- ISSN 1415-4765, 2019.

MORAES, V. de ; LOCATELLI, C. Vinho: uma revisão sobre a composição química e benefícios à saúde. **Evidência**, V. 10, p. 57-68, 2010.

MOZZAQUATRO, J. Resíduos de fungicidas em vinhos de diferentes propriedades vitivinícolas do Rio Grande do Sul, Brasil, frente ao uso da tecnologia thermal pest control a campo. **Revista Inst. Adolfo Lutz**, V. 75, p.1714, 2016.

MULDER, M. Basic principles of membrane technology. **Kluwer Academic Publishers**, 1991. 363 p.

OIV - Organização internacional da uva e do vinho. Producción de vino de 2019. Acesso em: MAI 2020.

OLIVA, J.; ZALACAIM, A.; PAYA, P.; SALINAS, M. R.; BARBA, A. Effect of the use of recent commercial fungicides [under good and critical agricultural practices] on the aroma composition of Monastrell red wines. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, vol. 617, p. 107-118, 2008.

OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. F. Comparação de métodos por cromatografia líquida na determinação de multirresíduos de agrotóxicos em morangos. **Química Nova**, v. 38, p. 1273-1281, 2015.

PALÁCIOS, V.M.; CARO, I.; PÉREZ, L. Comparative study of crossflow microfiltration with conventional filtration of sherry wines. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 95-102, 2002.

PEYSSON, W. ; VULLIET, E. Determination of 136 pharmaceuticals and hormones in sewage sludge using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by analysis with liquid chromatography–time-of-flight-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1290, p. 46–61, 2013.

PEREIRA, A.R. Remoção de carbendazim de água por processo de clarificação acoplado à adsorção ou cloração. 2018. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia

Ambiental) – Núcleo de Pesquisas e Pós-Graduação em Recursos Hídricos, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

PINTO, D.M.G.; BARROS, S.T.D.; BARROS Jr, C.; OLIVEIRA, R.C.; COSTA, S.C. Clarificação de vinho branco por ultrafiltração utilizando membranas cerâmicas. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 305-312, 2008.

PMRA. Pest Management Regulatory Agency. Re-evaluation of Carbendazim. Re-evaluation Note. REV2006-3. 2006.

PMRA. Pest Management Regulatory Agency. Registration decision. Carbendazim. REV2011-11. 2011.

PPDB. Pesticides Properties DataBase. Carbendazim (Ref: BAS 346F). Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/116.htm>. Acesso em: JAN 2020. Publicado em 05 Nov 2019. 2019a.

PPDB. Pesticides Properties DataBase. Indoxacarb (Ref: DPX KN128). Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/399.htm>. Acesso em: JAN 2020. Publicado em 11 Nov 2019. 2019b.

RAMADAN, G., AL JABIR, M., ALABDULMALIK, N., MOHAMMED, A. Validation of a method for the 465 determination of 120 pesticide residues in apples and cucumbers by LC-MS/MS. **Drug Testing & 466 Analysis**, 8(5–6), 498–510, 2016.

REICHERT J.F.; PIZZUTTI I.R.; DIAS J.V.; CARDOSO C.D. Determinação de fungicidas em suco de laranja por UPLC-MS/MS. **Scientia Chromatographica**, v. 7(4), p. 251-259, 2015.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B., COLLINS, C. H., FONTES JARDIM, I. C. S., COSTA MELO, L. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27(5), p. 771–780, 2004.

RIBEREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. **Handbook of Enology, The chemistry of wine, stabilization and treatments**, v. 2. 2^a Edição. Dunod: Paris, 2006.

RIZZON, L. A. Vinho branco. **Embrapa Informação Tecnológica**, 46 p., Brasília, DF, 2009.

ROMAGNA, Antonio Luis. Manejo da área foliar na qualidade da uva e características sensoriais do vinho cv. Chardonnay (*Vitis vinifera L.*) cultivada na Serra Gaúcha. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, 2018, 103 f.

RUOCCO, S.; MATTIVI, F.; PERENZONI, D.; ANGELI, A.; STEFANINI, M.; RÜHL, E.; PATZ, C.D.; RAUHUT, D.; VRHOVSEK, U. Metabolite profiling of wines made from disease-tolerant varieties. **European Food Research and Technology**, v. 245, p. 2039-2052, 2019.

SANTE/11813/2017. Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. v. 11813, p. 1–42, 2017.

SCIENCE DIRECT. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/>. Acesso em: NOV 2020.

SEGUENKA, B.; BRIÃO, V.B.; SILVEIRA, C.; SALLA, A.C.; CASTOLDI, S. Clarificação de vinho tinto pelo processo de separação por membranas. **Global Science and Technology**, Rio Verde, v. 7, n. 3, p. 119-126, 2014.

SÉRALINI, GE; DOUZELET, J. The Taste of Pesticides in Wines. **Food & Nutrition Journal**, FDNJ-161. DOI: 10.29011/2575-7091. 100061, 2017.

TONIETTO, J. O Clima Vitícola das Regiões Produtoras de Uva para Vinhos Finos no Brasil. “In” TONIETTO, J.; RUIZ, V. S.; GÓMEZ-MIGUEL, V. D. Clima, Zonificación y Tipicidad del Vino en Regiones Vitivinícolas Iberoamericanas. **Cyted**,

Madrid, 1 ed., p. 105-144, 2012.

TREVISOLI, A. M. S. Estudo experimental da microfiltração tangencial com membrana cerâmica aplicada na clarificação da vinhaça. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos SP, 2010, 155 f.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Thiophanate-Methyl and Carbendazim (MBC). Human Health Assessment Scoping Document in Support of Registration Review. **Memorandum**. 2014.

URKIAGA, A.; FUENTES, L.L.; ACILU, M.; URIARTE, J. Membrane comparison for wine clarification by microfiltration. **Desalination**, v.148, p. 115-120, 2002.

VESSECCHI, R.; LOPES, N.P. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1875-1887, 2011.

WANG, Y. L.; WANG, Z. Y.; JIA, C. X.; JIANG, H. X.; LI, M. D.; YANG, M. Fate tracing for 12 residual fungicides in grapes during vinification process. **Food and Fermentation Industries**, v. 42, p.114–118, 2016.

WHO. World Health Organization. 2018. Pesticide residues in food. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pesticide-residues-in-food>. Acesso em: JAN 2020.

WURTZ, D. A.; FILHO, J.L.M.; BEM, B.P.; ALLEBRANDT, R.; OUTEMANE, M.; RUFATO, L. Panorama e perspectivas da comercialização de espumantes no Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INOVAÇÃO EM CADEIAS PRODUTIVAS DO AGRONEGÓCIO, 2., 2016, Caxias do Sul. Anais... Caxias do Sul: 26 e 27 ago. 2016. Disponível em: <http://www.ucs.br/etc/conferencias/index.php/IIsimposioinovacaoagronegocio/simposioinovacaoagronegocioucs/paper/viewFile/4597/1442>. Acesso JAN 2020.

ZANINI, M.; PAGNONCELLI, M.; BALDASSO, C. Caracterização morfológica e parâmetros funcionais de membrana cerâmica multitubular. **Engevista**, v. 19, n.3, p. 699-712, 2017.

ZOUBEIK, M.; ISMAIL, M.; SALAMA, A.; HENNI, A. New Developments in Membrane Technologies Used in the Treatment of Produced Water: A Review. **Arab J Sci Eng**, DOI 10.1007/s13369-017-2690-0. 2017.