



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Desenvolvimento e validação de método multirresíduo,
empregando GC-ECD e GC-MS, para a investigação de
pesticidas em morango, maçã e uva**

KARINE KOCHHANN RHODEN

PPGQ

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
MULTIRRESÍDUO, EMPREGANDO GC-ECD E GC-MS, PARA A
INVESTIGAÇÃO DE PESTICIDAS EM MORANGO, MAÇÃ E UVA**

por

Karine Kochhann Rhoden

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, Área de
Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria
(UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de

MESTRE EM QUÍMICA

PPGQ

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**Desenvolvimento e validação de método multirresíduo,
empregando GC-ECD e GC-MS, para a investigação de
pesticidas em morango, maçã e uva**

elaborada por

Karine Kochhann Rhoden

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Renato Zanella – Orientador
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Profª Drª Tânia Mara Pizzolato
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Profª Drª Martha Bohrer Adaime
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Santa Maria, 03 de março de 2005

O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.

FERNANDO PESSOA

A minha mãe, Lorti, que corajosa, me ajudou a crescer, apesar de todas dificuldades que juntas enfrentamos, tentando da melhor forma me proporcionar o que considera o maior bem que os pais podem dar aos seus descendentes: o conhecimento. Tu sabes o quanto te devo.

Obrigada por tudo. Te amo!

Ao amor da minha vida, Everton.

Estamos a muito tempo nesta jornada e se Deus quiser teremos muitas outras coisas para viver e compartilhar.

Agradeço por sempre acreditar em mim, mesmo nas horas que nem eu mesmo acreditava, por sempre apostar em minha capacidade e por acreditar que chegaremos muito além de nossos sonhos.

Obrigada pelo ombro amigo, pela força e principalmente pela paciência.

Tu sabes, te amo!

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xv
RESUMO.....	i
ABSTRACT	iii
ABSTRACT	iii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. O BRASIL E A PRODUÇÃO DE FRUTAS	5
2.2. FRUTAS ESCOLHIDAS PARA O ESTUDO	6
2.2.1. Morango.....	7
2.2.2. Maçã	8
2.2.3. Uva	9
2.3. CONTROLE DE PRAGAS	11
2.4. PESTICIDAS AVALIADOS.....	12
2.5. TOXICIDADE DOS PESTICIDAS SELECIONADOS	13
2.6. LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUOS.....	15
2.7. PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM FRUTAS	17
2.7.1. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO	18
2.7.2. Determinação cromatográfica.....	25
2.7.3. Métodos multirresíduos em frutas e outras matrizes	27
2.8. PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS.....	30
2.8.1. Fator de retenção (k)	30
2.8.2. Resolução (Rs)	31
2.8.3. Fator de separação (α)	31
2.8.4. Curva de van Deemter.....	32
2.9. Validação de procedimentos analíticos	33
2.9.1. Curva analítica.....	33

2.9.2.	Linearidade	34
2.9.3.	Limite de Detecção e Limite de Quantificação	35
2.9.4.	Recuperação.....	36
2.9.5.	Precisão	37
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1.	REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAIS	38
3.2.	EQUIPAMENTOS.....	39
3.3.	GASES UTILIZADOS.....	40
3.4.	LIMPEZA DO MATERIAL UTILIZADO	40
3.4.1.	Silanização da vidraria.....	41
3.5.	PESTICIDAS SELECIONADOS	41
3.6.	PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS	42
3.7.	SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO	44
3.8.	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	45
3.8.1.	Estudo da vazão ótima do gás de arraste.....	46
3.8.2.	Vazão do gás complementar (make up) do detector	46
3.8.3.	Sistema de injeção.....	47
3.8.4.	Coluna cromatográfica e programação de temperatura.....	45
3.9.	AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA	47
3.10.	PREPARAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS	48
3.11.	TESTE EM BRANCO DA EXTRAÇÃO COM SOLVENTES	49
3.12.	AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS PARA USO COMO AMOSTRA BRANCO	49
3.13.	AVALIAÇÃO DA ADSORÇÃO DOS PESTICIDAS	50
3.14.	ESTUDO DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO.....	50
3.14.1.	Estudo do procedimento de purificação dos extratos	51
3.15.	VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO.....	52
3.15.1.	Curva analítica.....	52
3.15.2.	Linearidade	53
3.15.3.	Limite de detecção e limite de quantificação	53
3.15.4.	Procedimento de fortificação das amostras	54
3.15.5.	Recuperação.....	54
3.15.6.	Repetitividade	55
3.15.7.	Precisão intermediária	55
3.16.	APLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO DESENVOLVIDO	55

3.16.1.	Confirmação por GC-MS	56
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1.	SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO.....	58
4.2.	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	58
4.2.1.	ESCOLHA DA VAZÃO ÓTIMA DO GÁS DE ARRASTE	59
4.3.	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS ADOTADAS PARA A SEPARAÇÃO DOS PESTICIDAS EM ESTUDO POR GC-ECD.....	59
4.4.	AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA	60
4.5.	TESTE EM BRANCO DA EXTRAÇÃO COM SOLVENTES	61
4.6.	AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA USO COMO “BRANCO”	62
4.7.	AVALIAÇÃO DA ETAPA DE EXTRAÇÃO	64
4.8.3.	Estudo da adsorção dos compostos	63
4.9.	VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO DESENVOLVIDO	67
4.9.1.	Curva analítica.....	68
4.9.2.	Linearidade	70
4.9.3.	Limite de Detecção e Limite de Quantificação	71
4.9.4.	Repetitividade e precisão intermediária	73
4.9.5.	Recuperação.....	72
4.10.	APLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO DESENVOLVIDO	76
5.	CONCLUSÕES	80
6.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	84
7.	REFERÊNCIAS.....	85
	APÊNDICE A.....	95
	APÊNDICE B.....	104
	APÊNDICE C	106
	APÊNDICE D	109

AGRADECIMENTOS

Ao ensino público e de qualidade oferecido pela UFSM.

Ao Prof. Dr. Renato Zanella pela oportunidade de participar deste grupo de pesquisa, acolhendo-me primeiramente como aluna de iniciação científica, ensinando-me os primeiros passos na análise cromatográfica e posteriormente me acolhendo como aluna de mestrado sob sua orientação.

Ao Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel, participante da banca examinadora de qualificação, que com suas sugestões e questionamentos me ajudaram a aperfeiçoar o presente trabalho.

A Prof. Msc. Ionara Pizzutti que, apesar de estar em convalescença naquela data, foi uma importante presença no exame de qualificação no qual, através de suas correções minuciosas e sugestões pertinentes, proporcionou o aprimoramento e crescimento deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Martha Boher Adaime, sempre atenciosa, pelas sugestões e incentivos dados como integrante da banca examinadora da Defesa de Dissertação.

A Prof^a. Dr^a. Tânia Mara Pizzolato pelas sugestões e correções pertinentes realizadas como integrante da banca examinadora da Defesa de Dissertação.

Aos professores que em sala de aula compartilharam seus conhecimentos e contribuíram direta e/ou indiretamente para esta conquista.

Aos colegas do LARP, pela convivência e pelo intercâmbio de experiências e conhecimentos.

Fazendo um adendo, não posso deixar de fazer uma análise rápida destes dois anos de mestrado. Posso dizer, com certeza, que fui uma pessoa abençoada durante esse período pois conquistei vários amigos, cresci muito, tanto pessoalmente quanto intelectualmente, e tenho certeza que esta experiência irá me acompanhar pelo resto da vida.

Assim, agradeço a todos que estiveram presente comigo durante esta jornada, não só aqueles com os quais convivi e aprendi dentro do laboratório, compartilhando alegrias, conquistas, trabalho e muitas vezes fracassos, mas aqueles que se tornaram mais que colegas, emprestando o ombro amigo pra

desabafar as angústias e compartilhando de sua experiência e sabedoria nos momentos mais críticos.

Agradeço a Prof. Msc. Nádia De Monte Baccar, em especial, por ter me apoiado em um dos momentos mais difíceis de minha vida, oferecendo seus conselhos e seu ombro amigo.

À Leisa, devo a minha entrada no LARP. Agradeço a sua amizade, sua parceria e companheirismo.

Reservo ainda um agradecimento especial: aos “meus mestres”, que me acompanharam desde que entrei no LARP e, com o tempo, se tornaram meus amigos. Márcia, Fábio, obrigada pelos ensinamentos, pela ajuda, conselhos e acima de tudo pela amizade de vocês.

Também, não posso esquecer de agradecer outra grande amiga, a Emi. Sempre prestativa, de alto astral, tentando me colocar pra cima nos momentos mais complicados. Sentirei saudades de nossas conversas no corredor, nas escapadinhas no meio da tarde e nos almoços do RU.

E finalmente, mas não de menor importância, a minha grande amiga Aline. Assim que nos conhecemos uma grande afinidade nos aproximou, gerando em seguida uma grande amizade, a qual posso afirmar que foi um dos melhores frutos deste mestrado. Obrigada por seu companheirismo, amizade, sinceridade e força.

Saibam vocês, Márcia, Fábio, Emi e Aline, que sempre estarão dentro do meu coração.

Enfim, agradeço a Deus por mais esta conquista e a todos vocês pelo crescimento que me proporcionaram.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição nutricional média para morango.	8
Tabela 2. Composição nutricional média para maçã.....	9
Tabela 3. Composição nutricional média para a polpa de uva.	11
Tabela 4. Classificação toxicológica dos pesticidas.	13
Tabela 5. LMRs estabelecidos pela Legislação Brasileira, União Européia (UE) e Codex Alimentarius	17
Tabela 6. Princípios ativos utilizados com os respectivos fornecedores e graus de pureza.	41
Tabela 7. Preparo da solução analítica 3, em acetato de etila, obtida a partir da soluções analíticas 1 (1000 mg L ⁻¹) e 2 (100 mg L ⁻¹).	42
Tabela 8. Preparo das soluções analíticas, em acetato de etila e no extrato das matrizes utilizadas, obtidas a partir das soluções analíticas intermediárias 3 e 4.....	43
Tabela 9. Concentrações (mg L ⁻¹) das soluções analíticas contendo os princípios ativos em estudo, em solvente e nas matrizes, e suas respectivas numerações.	44
Tabela 10. Programas de temperatura do forno da coluna, utilizados na otimização da separação cromatográfica.....	45
Tabela 11. Código, locais de aquisição e origem das amostras de morangos avaliadas.	48
Tabela 12. Código, locais de aquisição e origem das amostras de maçã.....	48
Tabela 13. Código, locais de aquisição, origem e variedade das amostras de uva avaliadas.	49
Tabela 14. Concentrações dos princípios ativos em estudo nas matrizes (mg kg ⁻¹) e nos extratos finais (mg L ⁻¹) a partir dos três níveis de fortificação utilizados.	54
Tabela 15. Princípios ativos em estudo com seus respectivos tempos de retenção (t _R) no GC-MS e fragmentos utilizados para a sua identificação nos extratos das amostras.	57
Tabela 16. Parâmetros cromatográficos t _R , k, R _s e α obtidos para a separação da mistura dos compostos e PI, empregando a solução analítica 5.....	61

Tabela 17. Média dos percentuais de recuperação obtidos em testes preliminares, realizados com amostra de morango branco (A11) fortificada ao nível F2.	65
Tabela 18. Média dos percentuais de recuperação utilizando-se misturas de solventes descritos nos procedimentos P5 e P6, para amostra de morango branco (A11) fortificada ao nível F2.	66
Tabela 19. Parâmetros das curvas analíticas, para as faixas de concentração A e B, relacionados aos princípios ativos em solvente.	68
Tabela 20. Dados referentes às curvas analíticas para os pesticidas em estudo, nas faixas de concentração A e B, obtidas no extrato “branco” de morango.	69
Tabela 21. Dados referentes às curvas analíticas para os pesticidas em estudo, nas faixas de concentração A e B, obtidas no extrato “branco” de maçã.	69
Tabela 22. Dados referentes às curvas analíticas para os pesticidas em estudo, nas faixas de concentração A e B, obtidas no extrato “branco” de uva.	70
Tabela 23. Valores obtidos de LOD e LOQ instrumental (LOD_i e LOQ_i) e LOQ do procedimento (LOQ_p) para cada extrato de matriz analisado.	71
Tabela 24. Resultados de precisão em termos de repetitividade (RSD_{ri}) e precisão intermediária do instrumento (RSD_{pii}).	73
Tabela 25. Resultados de recuperação, precisão em termos de repetitividade (RSD_{rp}) e precisão intermediária (RSD_{pip}) do procedimento para as matrizes em estudo.	75
Tabela 26. Concentrações dos compostos estudados encontrados em amostras de morango.	78
Tabela 27. Concentrações dos princípios ativos estudados em amostras de maçã.	79
Tabela 28. Concentração dos pesticidas em estudo, encontrados em amostras de uva.	79
Tabela 29. Dados referentes ao cálculo de linearidade para os pesticidas em estudo.	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas dos compostos selecionados para este estudo.	12
Figura 2. <i>Manifold</i> para SPE usado para purificação dos extratos.....	52
Figura 3. Cromatograma da solução analítica 9, em acetato de etila, contendo o PI selecionado (lindano) e os nove pesticidas em estudo.....	59
Figura 4. Cromatograma do teste em branco.....	62
Figura 5. Cromatogramas de extratos de morango (A11), maçã (M2) e uva (G6) selecionados como “amostras branco” para estas matrizes.	63
Figura 7. Cromatogramas de amostras “branco” de morango, maçã e uva, A11, M2 e G6 respectivamente, fortificadas ao nível de F2 contendo o padrão interno (lindano) e os pesticidas em estudo.....	73
Figura 8. Cromatogramas obtidos a partir das amostra de morango (A4), maçã (M3) e uva (G3).....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- α – Fator de separação
- μ – Vazão ótima do gás de arraste
- a – Coeficiente angular
- ABPM – Associação Brasileira de Produtores de Maçã
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- b – Coeficiente linear
- C18 – Sílica modificada com hidrocarboneto linear C18
- d.i. – Diâmetro interno
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- GARP – Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas
- GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*
- GC-ECD - Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons, do inglês *Gas Chromatography – Electron Capture Detection*
- GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada a detecção por Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*
- GC-NPD – Cromatografia Gasosa com Detecção de Nitrogênio-Fósforo, do inglês *Gas Chromatography – Nitrogen-Phosphorous Detection*
- GC-FPD – Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização em Chama, do inglês *Gas Chromatography – Flame Ionization Detection*
- H – Altura equivalente a um prato
- ha – hectares
- IBRAF – Instituto Brasileiro de Frutas
- IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*
- k – Fator de retenção
- L – Comprimento da coluna cromatográfica
- LLE – Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*
- LMR – Limite Máximo de Resíduos
- LOD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*
- LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MSPD – Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês *Matrix Solid-Phase Dispersion*

N – Eficiência máxima da coluna cromatográfica

PI – Padrão Interno

PIF – Produção Integrada de Frutas

p.c. – peso corpóreo

Q – Concentração

r – Coeficiente de correlação

R – Recuperação

r^2 – Coeficiente de determinação

Rs – Resolução

RSD – Desvio padrão relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

RSD_{pi} – Desvio padrão relativo para precisão intermediária

RSD_{pii} – Desvio padrão relativo para precisão intermediária do instrumento

RSD_{pip} – Desvio padrão relativo para precisão intermediária do procedimento

RSD_r – Desvio padrão relativo para repetitividade

RSD_{ri} – Desvio padrão relativo para repetitividade do instrumento

RSD_{rp} – Desvio padrão relativo para repetitividade do procedimento

S – Sinal

SIM – monitoramento de íons, do inglês *Single Ion Monitoring*

SPE – Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid-Phase Extraction*

SPME – Microextração em fase sólida, do inglês *Solid-Phase Micro-Extraction*

t – Toneladas

t'_R – Tempo de retenção ajustado

t_M – Tempo de saída de uma analito não retido

t_R – Tempo de retenção de um analito

u.r. – Unidades de resposta

W_b – Largura do pico na base

W_h – Largura do pico à meia altura

x – Concentração do composto em estudo

x_i – Valores individuais

y – Resposta do detector (altura ou área do pico)

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA - PPGQ
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA - UFSM

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO, EMPREGANDO GC-ECD E GC-MS, PARA A INVESTIGAÇÃO DE PESTICIDAS EM MORANGO, MAÇÃ E UVA

Autora: Karine Kochhann Rhoden

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria, 03 de março de 2005

O uso de pesticidas é ainda a principal estratégia no campo para o combate e a prevenção de pragas agrícolas, garantindo alimento suficiente e de qualidade para a população. Na fruticultura, em especial nas culturas de morango, maçã e uva, a contaminação por resíduos de pesticidas têm sido alvo de constante preocupação no âmbito da saúde pública e da sociedade. Devido à toxicidade associada a estas substâncias o monitoramento da qualidade dos alimentos produzidos é necessário a fim de prevenir possíveis riscos ao consumidor.

No presente trabalho foi desenvolvido e validado um método multirresíduo para a quantificação dos pesticidas clorotalonil, clorpirifós, captana, procimidona, cresoxim metílico, iprodiona, fenpropatrina, deltametrina e azoxistrobina empregando Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons (GC-ECD) em diferentes matrizes (morango, maçã e uva). A Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS) foi empregada para a investigação da presença de pesticidas nas amostras. Algumas condições de extração foram avaliadas, tais como tipo e volume de

solventes, quantidade de amostra e purificação do extrato. A extração com mistura 1:1 (v/v) de acetato de etila/n-hexano, em ultra-turrax, seguida de purificação em colunas de florisil[®] e redução do volume do extrato por evaporação do solvente foi a que apresentou melhores resultados.

As condições otimizadas para o sistema GC-ECD foram: coluna capilar DB-5; programação da temperatura do forno: 80 °C – 2 min, 180 °C (10 °C min⁻¹) – 1 min, 255 °C (8 °C min⁻¹); 315 °C (15 °C min⁻¹) – 4,25 min, pressão do gás de arraste (He) 21 psi; volume de injeção 1 µL; temperatura do injetor 270 °C e do detector a 330 °C. Para a análise por GC-MS usaram-se as condições: coluna capilar VF- 5MS, *Factor Four*/MS (Varian) com 5 m de EZ-Guard[®]; programação da temperatura da coluna de: 80 °C (25 °C min⁻¹), 180 °C (5 °C min⁻¹), 280 °C – 10 min, pressão do gás de arraste 10 psi; volume de injeção 1 µL, no modo *splitless*; temperatura do *manifold* de 80 °C e da interface de 230 °C, energia de 600 eV aplicada à multiplicadora de íons e temperatura do *ion-trap* a 200 °C.

Na validação do método foram avaliados os seguintes parâmetros: limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e recuperação. Os LODs e LOQs do instrumento variaram de 2,5 a 18,7 µg L⁻¹ e de 5,0 a 25,0 µg L⁻¹, exceto para a deltametrina (0,2 e 0,8 µg L⁻¹), respectivamente. Para as amostras analisadas obtiveram-se valores de LOQs de 0,6 a 15,6 µg kg⁻¹ para os pesticidas em estudo. As soluções analíticas foram preparadas em extrato “branco” das frutas para compensar o efeito matriz observado, obtendo-se curvas analíticas com $r^2 \geq 0,9925$. Os ensaios de precisão forneceram resultados aceitáveis, com valores de RDS entre 0,3 e 14,8%. Recuperações de 85,4 a 111,3% foram obtidas para as matrizes estudadas, exceto para a captana (70,1%) em uva.

Os resultados obtidos na validação permitiram concluir que o método é adequado para determinação destes compostos em morango, maçã e uva, sendo o método aplicado na análise de 21 amostras obtidas no comércio. Foram constatadas presenças de pesticidas em 72,7% das amostras de morango, 80% das amostras de maçã e de uva, onde foram encontrados clorpirifós, clorotalonil, captana, iprodiona, deltametrina e fenpropatrina.

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA – UFSM

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF MULTIRESIDUE METHOD,
USING GC-ECD AND GC-MS, FOR THE INVESTIGATION OF PESTICIDES IN
STRAWBERRY, APPLE AND GRAPE**

Author: Karine Kochhann Rhoden

Adviser: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria, 3 March 3th, 2005

Pesticides use is still the main strategy used in the field for the combat and the prevention of agricultural plagues, guaranteeing enough food and of quality for the population. In the culture of fruits, especially in strawberries, apples and grapes, the consequent contamination by pesticide residues has been the objective of constant concern in the ambit of the public health. Due to the toxicity associated with these substances quality of the produced victuals is necessary in order to prevent possible risks to the consumer.

In the present study, a multiresidue method was developed and validated for the quantification of the pesticides chlorothalonil, chlorpyrifos, captan, procymidone, kresoxim methyl, iprodione, fenpropathrin, deltamethrin and azoxystrobin using Gas Chromatography with Electron Capture Detection (GC-ECD) in different matrices (strawberry, apple and grape). Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC-MS) was used for the investigation of the pesticides present in the samples. Some extraction conditions were appraised, such as type and volume of solvents, amount of sample and purification of the extract. The extraction with 1:1 (v/v) mixture of ethyl acetate/n-hexane, in ultraturrax, followed by purification in florisil[®] columns and reduction of the extract volume by evaporation of the solvent presented the best results.

The optimized conditions for the GC-ECD system were: capillary column DB-5; programming of the oven temperature: 80 °C - 2 min, 180 °C (10 °C min⁻¹) - 1 min, 255 °C (8 °C min⁻¹); 315 °C (15 °C min⁻¹) – 4.25 min, pressure of the carrier gas (He) 21 psi; injection volume 1 µL; injector temperature 270 °C and of the detector to 330 °C. For the analysis by GC-MS the used conditions were: capillary column VF - 5MS, Factor Four/MS (Varian) with 5 m of EZ-Guard®; programming of the column temperature: 80 °C (25 °C min⁻¹), 180 °C (5 °C min⁻¹), 280 °C - 10 min, pressure of the carrier gas 10 psi; injection volume 1 µL, in the splitless mode; temperature of the manifold of 80 °C and of the interface of 230 °C, energy of 600 eV applied to the ion multiplier and ion-trap temperature of 200 °C.

In the validation of the method the following parameters were verified: detection limit (LOD), quantification limit (LOQ), linearity, precision (repeatability and intermediary precision) and recovery. LODs and LOQs of the instrument varied from 2.5 to 18.7 µg L⁻¹ and from 5.0 to 25.0 µg L⁻¹, except for the deltamethrin (0.2 and 0.8 µg L⁻¹), respectively. For the analyzed samples obtained LOQs values from 0.6 to 15.6 mg kg⁻¹ were obtained for the pesticides in study. The analytical solutions were prepared in "blank extract" of the fruits to compensate for the observed matrix effect, being obtained analytical curves with $r^2 \geq 0.9925$. The precision assays supplied acceptable results, with RDS values between 0.3 and 14.8%. Recoveries from 85.4 to 111.3% were obtained for the studied matrices, except for captan in grape (70.1%).

The results obtained in the validation allowed us to conclude that the method is adaptable for the determination of these compounds in strawberries, apples and grapes, being that the method was applied in the analysis of 21 samples obtained in the trade. Pesticides presences were verified in 72.7% in the strawberry samples, 80% of the apple and grape samples, where chlorpyrifos, chlorothalonil, captan, iprodion, deltamethrin and fenpropathrin were found.

1. INTRODUÇÃO

Com o crescimento da população mundial e conseqüente necessidade de aumento da produção de alimentos, os pesticidas vêm sendo utilizados para combater doenças fitossanitárias, pragas e ervas daninhas que atacam as culturas, bem como os alimentos estocados. Estas, quando consideradas conjuntamente as etapas de desenvolvimento, maturação, colheita e estocagem somam perdas de quase um terço da produção total de alimentos (WARE, 1998 e FRENICH *et al.*, 2004). Assim, com o intuito de reduzir danos, o uso de pesticidas é oficialmente autorizado pelos órgãos governamentais, após devido registro das formulações para as culturas onde serão utilizadas. O uso inadequado e/ou excessivo de pesticidas pode, porém, acarretar a contaminação de produtos de origem vegetal e animal, inclusive por meio da cadeia alimentar, podendo até ter como conseqüências o comprometimento da saúde humana e do meio ambiente (BARRETO *et al.*, 1996; FRENICH *et al.*, 2004 e CALDAS & SOUZA, 2000).

Assim, com a toxicidade relacionada aos pesticidas, tais como efeitos adversos ao sistema nervoso central e periférico, ação imunodepressora ou agente cancerígeno (CALDAS & SOUZA, 2000), são necessários programas de monitoramento da qualidade dos alimentos produzidos, como uma regulamentação do comércio internacional, a fim de prevenir possíveis riscos ao consumidor (FRENICH *et al.*, 2004).

Apesar da crescente utilização e desenvolvimento de novos pesticidas para uso na agricultura, cerca de 9000 espécies de insetos, 50000 espécies de patógenos de plantas e 8000 tipos de ervas daninhas podem ser responsáveis pela baixa produtividade ou perda das culturas (ARAÚJO *et al.*, 2000). A necessidade crescente no aumento da produção aliado à falta de técnicas alternativas seguras na maioria das culturas para o incremento desta, acarretam numa provável dependência do uso de pesticidas por um longo período de tempo (ZAVATTI & ABAKERLI, 1999).

Atualmente, o Brasil através de seu órgão regulador, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), tem registrados 396 diferentes ingredientes ativos para o uso como pesticida, sendo distribuídos em mais de 2000 produtos registrados, com aproximadamente 2300 Limites Máximos de Resíduos (LMRs) estabelecidos para 265 culturas (ANVISA, 2004).

O uso de pesticidas na fruticultura e a conseqüente contaminação das frutas, têm sido alvo de constante preocupação no âmbito da saúde pública e da sociedade (SBF, 2004). As culturas de maçã, morango e uva têm um longo histórico de contaminações por pesticidas, sendo o morango apontado como uma das frutas mais incidentes nestes casos. A ANVISA tem registrados em seus bancos de dados 29, 83 e 51 diferentes princípios ativos permitidos para uso nas culturas de morango, maçã e uva, respectivamente. Com a adoção do Programa Integrado de Frutas (PIF) nestas culturas objetiva-se sistematizar o uso de pesticidas, através de banco de produtos recomendados, e controlar a qualidade das frutas produzida através do emprego de Boas Práticas Agrícolas, onde a produção é acompanhada por técnicos e os prazos de carência são obedecidos.

O morango atualmente cultivado em larga escala, tem como origem o cruzamento das espécies *Fragaria virginiana* e *Fragaria chiloenses*, oriundas, da América do Norte e Chile. Possui como clima ideal o temperado podendo ser cultivada também como planta perene, porém, com drástica redução de produtividade de um ciclo para o outro em função da suscetibilidade a doenças fúngicas, bacterianas, viróticas e infestações por nematóides (BONNECARRÈRE, 2002). Cultivado no sistema convencional, o morangueiro pode receber em média 45 pulverizações de pesticidas, motivo pelo qual já se encontra na lista negra dos alimentos campeões de resíduos químicos (BERBARI *et al.*, 1998).

A maçã (*Malus domestica*) tem como origem a região entre o Cáucaso e o leste da China e, por serem frutas saborosas, ricas em vitaminas e outros minerais, tiveram seu consumo muito difundido em todo mundo, existindo atualmente cerca de 6000 espécies cultivadas (SBD, 2005). No Brasil, o cultivo da macieira em escala comercial foi iniciado a partir da década de 1970 (SAQUET, 1997), tendo atualmente três espécies cultivadas, *gala*, *fugi* e *golden delicius* que correspondem a 97% da população das macieiras no sul do país (OPPERMANN, 2004).

A maçã brasileira conquistou os consumidores de outros países, especialmente europeus, que compram cerca de 20% da produção nacional, sendo um setor reconhecido pelo governo, pela sociedade e por todos os segmentos da fruticultura nacional freqüentemente apontado como exemplo pelo sucesso alcançado (EMBRAPA, 2004).

A uva é considerada um alimento tonificante, alcalinizante, anti-reumático, depurativo, diurético, laxante e um tônico para o sistema nervoso, sendo conhecida

desde a Antiguidade (BIBLIOTECA VIRTUAL DO ESTUDANTE BRASILEIRO, 2004). Dentre as 10 mil variedades diferentes de uvas, adaptadas a vários tipos de solo e de clima, as uvas frescas mais consumidas pelos brasileiros ou são da espécie *Vitis vinifera L.*, variedades Itália, Rubi, Benitaka, Brasil, Centenial, etc., ou da espécie *Vitis labrusca L.*, variedades Niagara, Isabel, ou ainda podem ser híbridas das 2 espécies como a variedade Kyoho (MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL, 2004). Doenças causadas por fungos, que afetam a cultura da videira, se constituem em um dos mais sérios problemas com que o viticultor se defronta, sendo, muitas vezes, responsáveis pelo insucesso da cultura, sendo seu tratamento dependente da variedade que está sendo cultivada (SINDICATO RURAL DE JUNDIAÍ, 2004).

Estudos sobre a presença de resíduos de pesticidas em alimentos, realizados por instituições brasileiras, têm apontado riscos para a saúde, como é o caso da banana, maçã e tomate, citados em recente estudo pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (SBF, 2004). Dentre as culturas analisadas por programas de monitoramento do Governo Federal (ANVISA), no período de junho de 2001 a junho de 2003, a do morango se destacou devido ao alto índice de contaminação detectado nas amostras advindas dos estados participantes (Pernambuco, Minas Gerais, São Paulo e Paraná), muitas das quais apresentaram-se contaminadas com resíduos de até cinco distintos ingredientes ativos (SBF, 2004).

A adoção do sistema de Produção Integrada de Frutas (PIF), apresentado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), vem como uma nova perspectiva para o agronegócio da fruticultura pois integra a exploração agrícola à produção de alimentos de alta qualidade, com a minimização do uso de insumos e contaminantes. Atualmente existem vários projetos em andamento de pesquisa em Produção Integrada (Maçã, Pêssego, Uva, Manga, Melão, Frutas cítricas, Banana, Goiaba, Figo, Mamão, Morango) sendo liderados pelas unidades da Embrapa em todo o país, onde o estudo pioneiro, em 1997, foi introduzido pela Embrapa Uva e Vinho de Bento Gonçalves (RS), na região sul do país, junto aos produtores de maçã e considerado como referência neste tipo de produção pelo sucesso alcançado (EMBRAPA, 2004).

Dentro deste contexto de prevenção e determinação de resíduos de contaminantes em frutas rotineiramente consumidas pela população em geral, este estudo foi conduzido com o objetivo de desenvolver um método multirresidual para a determinação de alguns pesticidas utilizados nas culturas do morango, maçã e uva. Dentre os compostos escolhidos, encontram-se os fungicidas azoxistrobina, captana, clorotalonil, cresoxim metílico, iprodiona e procimidona e os inseticidas deltametrina, fenpropatrina e clorpirifós. Empregou-se Cromatografia Gasosa (GC) com Detecção por Captura de Elétrons (ECD, do inglês *electron-capture detection*) para a detecção destes pesticidas e a Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography - Mass Spectrometry*), no modo de varredura *full scan*, para investigação da presença de pesticidas nas amostras, e o modo SIS para a confirmação. O procedimento desenvolvido foi aplicado na investigação de resíduos de pesticidas em amostras adquiridas no comércio local, provindas de diferentes pólos produtores.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O Brasil e a produção de frutas

Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, só estando abaixo da China e da Índia, porém ainda com volumes de exportação pequenos em relação ao que produz, somente cerca de 1,3% da produção total do país (ANDRIGUETO, 2004).

Com objetivos de ampliar as exportações, atingir os padrões de qualidade exigidos pelo mercado internacional e controlar a qualidade das frutas produzidas no país, o Governo Brasileiro, através da EMBRAPA, está instituindo, gradualmente, para cada cultura, um sistema de Produção Integrada de Frutas (PIF) que, estruturado a partir da cadeia produtiva da maçã, fechou o ano de 2004 com 16 espécies frutíferas incluídas. Do total, 11 com os selos de conformidades aprovados e institucionalizados pelo MAPA, normas técnicas específicas concluídas e em condições de operacionalização. Maçã, uva, manga, mamão, frutas cítricas, caju, coco, banana, melão, pêssego/nectarina, goiaba, caqui, maracujá, morango, figo e abacaxi fazem parte da lista de produtos da PIF. Atualmente, o Brasil tem 2,3 milhões de hectares utilizados na fruticultura e, desse total, 35,5 mil hectares (1,5%) estão incluídos no sistema de produção integrada (GAZETA MERCANTIL, 2004).

No ano de 2004, apesar das perdas provocadas por problemas climáticos, a fruticultura brasileira alcançou com um novo recorde de exportações, de US\$ 370 milhões, o equivalente a 850 mil toneladas de frutas, segundo cálculos do setor. Esse desempenho representou um crescimento de 10% em valor e de 5% em volume em relação a 2003, de acordo com o Instituto Brasileiro de Frutas (IBRAF). A previsão da entidade e do MAPA é de que as vendas externas do segmento possam ter um aumento de 20% na quantidade embarcada em 2005, em comparação com 2004, caso não ocorram quebras causadas por intempéries.

Os prejuízos provocados pela seca e o excesso de chuvas às culturas de mamão no Espírito Santo e de uva, melão e manga no Nordeste foram compensados pelo excepcional desempenho das exportações de maçãs. No ano de 2004, as vendas externas do produto renderam ao país US\$ 72,5 milhões, com um acréscimo de 92% sobre os US\$ 37,8 milhões faturados em 2003. Em volume, o

aumento foi de 112%, com embarques de 153.000 t, contra 76.400 toneladas do período anterior (MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL, 2005).

A cultura do morango, por sua vez, um dos segmentos de extrema importância da produção agrícola gaúcha para a economia, fechou o ano de 2004, de acordo com a Embrapa (AGRITEMPO, 2005), com uma produção de cerca de 150 t, com perspectivas de ampliação a 200 t para a próxima safra (2005), sendo exportadas em torno de 17 t do produto gaúcho para países como Alemanha, Holanda, Espanha e França, através de incentivos proporcionados pela SebraExport Frutas.

2.2. Frutas escolhidas para o estudo

As frutas têm grande importância na programação de uma alimentação equilibrada e, conseqüentemente, para a saúde humana. Elas fornecem água, calorias, celulose, carboidratos, vitaminas, minerais e até mesmas proteínas, como é o caso da goiaba e do abacate (SBF, 2004).

Além do valor alimentício e de serem necessárias ao o bom funcionamento do sistema digestivo, as frutas fornecem fontes de sais minerais indispensáveis à formação de ossos, dentes e sangue. Contribuem para a variação de nossa alimentação e, pela sua convidativa apresentação, aumentam a estética da mesa, aumentando nosso apetite e consumo.

A desigualdade do solo brasileiro, sua variada composição e os mais diversos climas permitem o cultivo de um grande número de plantas frutíferas, nas diferentes regiões do país (CURTI, 2003).

O crescimento da conscientização, nas populações do mundo inteiro, sobre a necessidade de consumir um alimento sadio, é cada vez maior. Nos últimos anos pode-se comprovar que são várias as ocorrências sobre os malefícios de uma alimentação inadequada. Resultado disso é que, as legislações de vários países estão cada vez mais rígidas nas questões alimentares, conseqüentemente, indicando a necessidade de atender as novas exigências do consumidor e do mercado (AGRORGÂNICA, 2004).

2.2.1. Morango

O morangueiro é uma planta pertencente à família das rosáceas, sendo a única hortaliça cultivada desta família. Os morangos têm uma história oriunda de 2200 anos. Embora existam registros de diferentes espécies de morangos silvestres conhecidos por toda a Europa, presume-se que essas frutas tenham sido levadas para cultivo em hortas caseiras apenas por volta do século XV (BIBLIOTECA VIRTUAL DO ESTUDANTE BRASILEIRO, 2004).

Atualmente cultivado em larga escala, tem como origem o cruzamento das espécies *Fragaria virginiana* e *Fragaria chiloenses*, oriundas, respectivamente da América do Norte e Chile. Possui hábito rasteiro e características da planta herbácea, tendo no clima temperado o seu ambiente ideal. É uma planta que, apesar de poder ser cultivada como perene, em função de suscetibilidade a doenças fúngicas, bacterianas, viróticas e infestações por nematóides, tem sua produtividade reduzida drasticamente de um ciclo para o outro (BONNECARRÈRE, 2002). Cultivado no sistema convencional, o morangueiro pode receber em média 45 pulverizações de pesticidas, motivo pelo qual já se encontra na lista negra dos alimentos campeões de resíduos químicos (BERBARI *et al.*, 1998).

Não há informações precisas sobre o início do cultivo no Brasil, mas os principais produtores são os paulistas, mineiros, catarinenses e gaúchos. Atualmente, as regiões de maior produção de morango no Rio Grande do Sul são o Vale do Caí, em morangos de mesa, e a região de Pelotas, com morangos destinados a produção industrial (MORANGUITOS, 2004).

O morango é um fruto de baixa caloria, rico em pectina e outras fibras solúveis que auxiliam na redução do colesterol. Contém bioflavonóides, como a antocianina e o ácido elágico, substâncias que ajudam a prevenir alguns tipos de câncer, vitamina C e são uma boa fonte de folato, potássio, riboflavina e ferro (SBD, 2005). Os dados nutricionais deste fruto estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1. Composição nutricional média para morango.

Composição em 100 g de morango	
Glicídios	7,4 g
Proteínas	1,0 g
Lipídios	0,6 g
Cálcio	22,0 mg
Fósforo	22,0 mg
Ferro	0,9 mg
Sódio	31,5 mg
Potássio	155,2 mg

Fonte: SBD, In: Dicionário dos alimentos, disponível em http://www.diabetes.org.br/dicionario_alimentos/dic_m.php.

2.2.2. Maçã

A macieira, pertencente à família Rosaceae (ordem Rosales), subfamília Pomoideae (tribo: Malae; gênero: *Malus*, Milller; série: Pumilae), iniciou sua evolução aproximadamente há 25 milhões de anos, tendo como centro de origem a região entre o Cáucaso e leste da China. No Brasil, o cultivo da macieira em escala comercial foi iniciado a partir da década de 1970 (SAQUET, 1997), tendo atualmente três espécies cultivadas, *gala*, *fugi* e *golden delicius* que correspondem a 97% da população das macieiras no sul do país (OPPERMANN, 2004).

Atualmente, com incentivos fiscais e apoio à pesquisa e extensão rural, o sul do Brasil aumentou a produção de maçãs em quantidade e em qualidade, fazendo com que o país passasse de importador a auto-suficiente e com potencial de exportação. Em levantamentos feitos pela Associação Brasileira de Produtores de Maçãs (ABPM), verificou-se que na safra de 2001, aproximadamente 2700 produtores estiveram envolvidos na cultura e a área plantada foi de cerca de 30.000 ha, com produção estimada de 800.000 t. A maçã brasileira já conquistou os consumidores de outros países, especialmente os europeus, e entre 10 a 20 % dos frutos são exportados para diversos mercados, principalmente para a Europa (EMBRAPA, 2005).

Rica em vitaminas do complexo B e C, betacaroteno, cálcio, magnésio, fósforo e potássio, como demonstra a Tabela 2, o consumo de maçãs é muito difundido como modo de prevenção de diversas doenças tais como doenças coronárias e câncer (SBD, 2005).

Tabela 2. Composição nutricional média para maçã.

Composição por 100 g de maçã	
Glicídios	14,2 g
Proteínas	0,4 g
Lipídios	0,5 g
Cálcio	7,0 mg
Fósforo	12,0 mg
Ferro	0,3 mg
Sódio	13,6 mg
Potássio	160,0 mg

Fonte: SBD, In: Dicionário dos alimentos, disponível em http://www.diabetes.org.br/dicionario_alimentos/dic_m.php.

2.2.3. Uva

A videira é uma das plantas frutíferas mais conhecidas desde a Antiguidade, podendo ser encontrada em fósseis de épocas geológicas anteriores mesmo ao aparecimento do homem na Terra. Primitivamente, a cultura da uva teve apenas um caráter doméstico, desenvolvendo-se para o comércio e para a exportação apenas com o desenvolvimento da navegação no Mar Mediterrâneo. Acredita-se que as uvas originaram-se na Ásia, tendo sido introduzidas na Península Itálica e na Europa pelos gregos. Foram os romanos, por sua vez, que transformaram a viticultura em um comércio lucrativo, enchendo as paisagens mediterrâneas de videiras. As uvas de então, ainda por vários séculos depois disso, destinavam-se, basicamente, à produção de vinho.

Há cerca de 10 mil variedades diferentes de uvas, adaptadas a vários tipos de solo e de clima, o que possibilita o seu cultivo em quase todas as regiões do mundo. Sendo frutas bastante sensíveis às condições do solo e do clima em que se desenvolvem, as uvas variam muito de acordo com essas condições, apresentando

características que as distinguem segundo o sabor, a acidez, a doçura, o formato, a coloração e a resistência da casca, o tamanho, a quantidade de sementes, a forma e o formato dos cachos (BIBLIOTECA VIRTUAL DO ESTUDANTE BRASILEIRO, 2004).

As várias doenças causadas por fungos que afetam a cultura da videira, se constituem em um dos mais sérios problemas com que o viticultor se defronta, sendo, muitas vezes, responsáveis pelo insucesso da cultura. O tratamento fitossanitário varia em função da variedade que está sendo cultivada, não só no que diz respeito ao número de pulverizações que devem ser feitas, mas também quanto aos tipos de fungicidas que devem ser aplicados, para controle das diferentes doenças a que ela está sujeita. A variedade *itália*, por exemplo, é muito mais suscetível às doenças do que a *niágara*, exigindo controle fitossanitário intensivo (SINDICATO RURAL DE JUNDIAÍ, 2004).

O cultivo da videira no Brasil teve início por volta do ano de 1535, na Capitania de São Vicente, trazida por colonizadores portugueses, mas somente adquiriu importância econômica com o advento da imigração italiana, que se estabeleceu nos Estados do Rio Grande do Sul e de São Paulo, no final do século XIX. Presentemente, somando pouco mais de 60.000 ha, a cultura da videira encontra-se estabelecida em quatorze estados brasileiros, se constituindo na base de sustentação da exploração agro-industrial de algumas regiões, não somente pela produção de uvas de mesa, mas também de matéria-prima para a elaboração de vinhos e vários derivados.

Atualmente, as uvas frescas mais consumidas pelos brasileiros ou são da espécie *Vitis vinifera L.*, variedades Itália, Rubi, Benitaka, Brasil, Centenial, etc., ou da espécie *Vitis labrusca L.*, variedades *niágara*, *isabel*, ou ainda podem ser híbridas das 2 espécies como a variedade *kyoho* (MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL, 2004).

Quanto às uvas de mesa, pode-se afirmar que houve relativa expansão da área plantada, principalmente em razão da implantação, em regiões que não as tradicionalmente produtoras, de cultivos de uvas finas, para atender não só ao mercado interno, mas também destinadas à exportação. É o caso da zona noroeste do Estado de São Paulo e, da Região Nordeste do país, áreas de produção de implantação relativamente recente e que já somam mais de 5.000 hectares plantados (SINDICATO RURAL DE JUNDIAÍ, 2004).

A uva é considerada um alimento tonificante, alcalinizante, anti-reumático, depurativo, diurético, laxante, tônico para o sistema nervoso. É um fruto rico em carboidratos, porém com pouca vitamina C e do complexo B. A composição nutricional deste fruto está demonstrada na Tabela 3.

Tabela 3. Composição nutricional média para a polpa de uva.

Composição por 100 g de polpa de uva	
Glicídios	16,7 g
Proteínas	0,6 g
Lipídios	0,7 g
Cálcio	12,0 mg
Fósforo	15,0 mg
Ferro	0,9 mg

Fonte: <http://www.belaischia.com.br/frutas/page/uva.html>

2.3. Controle de pragas

Pesticida é um termo utilizado para uma ampla gama de substâncias químicas, sintéticas ou naturais, empregadas para o controle de insetos, fungos, bactérias, ervas daninhas, nematóides, roedores e outras pragas. Desde o começo da era dos pesticidas orgânicos sintéticos, em meados de 1940, os pesticidas têm provido enormes benefícios no aumento da produção agrícola e na qualidade dos produtos obtidos, pois as pragas e doenças provocavam danos com perdas de até um terço da produção, quando somadas as fases de crescimento, colheita e armazenamento. Porém, a maioria dos pesticidas falha na degradação natural e com o crescimento rápido de seu uso, freqüentemente acompanhado de pesquisas técnicas insuficientes ou pouca precaução, infelizmente acabou por gerar muitos problemas ambientais e a exposição indireta dos seres humanos, normalmente associada a resíduos de pesticidas em produtos comestíveis (CHU *et al.*, 2005).

Atualmente, o Brasil através de seu órgão regulador, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), têm registrados 396 diferentes ingredientes ativos para o uso como pesticidas, sendo distribuídos em mais de 2000 produtos

registrados, com aproximadamente 2300 Limites Máximos de Resíduos (LMRs) estabelecidos para 265 culturas (ANVISA, 2004).

Por terem um ciclo de desenvolvimento mais longo, em geral, as frutas recebem um grande número de pulverizações de pesticidas, principalmente as que se apresentam mais atrativas para insetos e outras pragas. Assim, são consideradas culturas de alto risco de contaminação as de morango, goiaba, uva, maçã, pêsego, mamão, figo, pêra, melão e nectarina (JORNAL VIDA INTEGRAL, 2005).

2.4. Pesticidas avaliados

A Legislação Brasileira vigente tem registrados 29, 83 e 51 diferentes princípios ativos permitidos (ANVISA, 2005) para uso nas culturas de morango, maçã e uva, respectivamente e, dentre estes, foram escolhidos para fazerem parte deste estudo os princípios ativos relacionados na Figura 1.

A fim de se avaliar a contaminação nestas culturas, selecionaram-se alguns dos pesticidas mais comumente utilizados, permitidos ou não pela legislação atual (ANVISA, 2005) de uso rotineiro para estas frutas, ou de fácil comercialização, ficando assim disponíveis aos produtores.

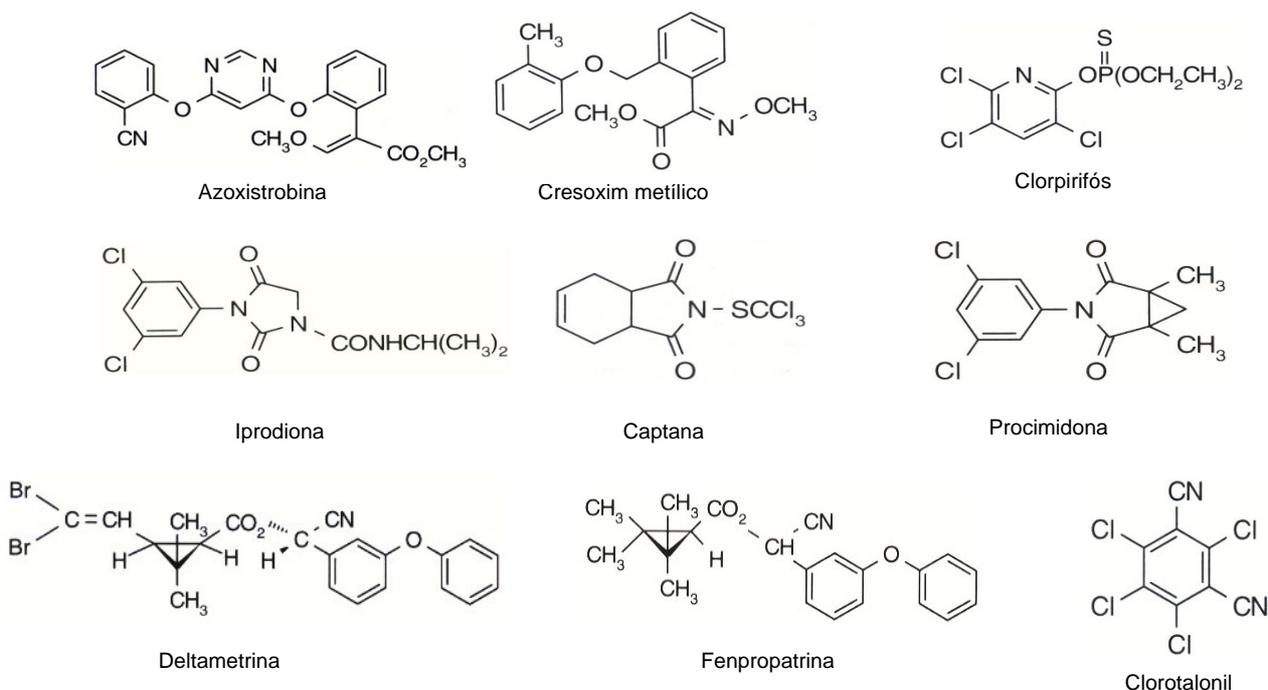


Figura 1. Estruturas químicas dos compostos selecionados para este estudo.

2.5. Toxicidade dos pesticidas selecionados

A toxicidade aguda de um pesticida, como produtos puros, técnicos ou formulados, é expressa pela quantidade, em mg kg^{-1} de peso corpóreo, necessária para provocar a morte de 50% de um lote de animais submetidos ao protocolo experimental. Expressa pela sigla DL_{50} (dose letal para óbito de 50% dos animais teste), nos estudos pela via oral ou dérmica e CL_{50} (concentração letal para óbito de 50% dos animais teste) nos estudos de absorção por via respiratória.

Em função dos valores de DL_{50} (oral ou dérmica) e CL_{50} , os pesticidas são classificados toxicologicamente em quatro classes distintas, conforme Portaria 04/DIAID de 30.04.1980 e Decreto Federal nº 98.816 de 11.01.1990, de acordo com os critérios apresentados na Tabela 4 (LARINI, 1997, p.10).

Tabela 4. Classificação toxicológica dos pesticidas.

Classificação	DL_{50} via oral (mg kg^{-1})		DL_{50} via oral (mg kg^{-1})		CL_{50} (inalatória) (**)
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos	
Classe I Extremamente tóxicos	≤ 100	≤ 200	≤ 200	≤ 400	$\leq 0,2$
Classe II Altamente tóxicos	100 - 500	200 - 2000	200 - 1000	400 - 4000	0,2 - 2,0
Classe III Medianamente tóxicos	500 - 2000	2000 - 6000	1000 - 4000	4000 - 12000	2,0 - 20,0
Classe IV Pouco tóxicos	≥ 2000	≥ 6000	≥ 4000	≥ 12000	$\geq 20,0$

(**) Expressa em mg L^{-1} de ar por 1 h de exposição.
Fonte: LARINI, 1999.

Com base na Tabela 4, os pesticidas selecionados para este estudo podem ser classificados em pouco (captana, iprodiona e procimidona), medianamente (azoxistrobina, cresoxim metílico, clorotalonil e deltametrina), e altamente tóxicos (clorpirifós e fenpropratrina).

Pertencente a família dos ftalimídicos, a captana é uma fungicida de contato utilizado para controle de doenças, com maior uso na cultura da maçã (PESTICIDAS Y PLAGUICIDAS, 2005). Possui DL_{50} , pela via oral, de 7840 e 7000 mg kg^{-1} em camundongos machos e em fêmeas, respectivamente e, depois da administração oral em ratos, aproximadamente 90% da captana é excretada nas primeiras 24 h,

através da urina (cerca de 52%), fezes (cerca de 23%) e ar expirado, sendo porções reduzidas armazenadas nos órgãos sob a forma de produtos biotransformados (LARINI, 1999).

A iprodiona, fungicida pertencente à família dos succinimídicos, estruturalmente semelhantes à N-(3,5-diclorofenil)succinimida (NDPS), também chamada carboximídicos, apresenta DL₅₀ aguda oral, em ratos, de 4000 mg kg⁻¹. Compostos succinimídicos são dotados de baixa toxicidade aguda para mamíferos, seja pela via oral ou dérmica. Todavia, experimentos realizados em animais de laboratório indicam que estes compostos, especialmente o NDPS são nefrotóxicos, chegando a causar extensa necrose nos túbulos proximais quando administrado peritonalmente, em doses de 1,0 mmol kg⁻¹, em ratos (LARINI, 1999).

Fungicida sistêmico com propriedade curativas e protetoras, a procimidona possui valores de DL₅₀ oral aguda de 6800 e 7800 mg kg⁻¹ para ratos machos e fêmeas, respectivamente, e DL₅₀ dérmica aguda > 2500 mg kg⁻¹. É rapidamente excretado em mamíferos (TOMLIN, 2000) porém estudos demonstram efeitos significativos no fígado e no sistema reprodutor quando animais de laboratório são expostos por longo tempo a este fungicida (SUMITOMO CHEMICAL, 2005).

Os pesticidas azoxistrobina e cresoxim metílico pertencem à família das estrobilurinas, fungicidas sintéticos derivados de metabólitos produzidos por fungos *strobilurus tenacellus*, estando com uso ainda sob caráter experimental em alguns países (CHRISTENSEN & GRANBY, 2001). Possuem valores de DL₅₀ oral aguda para ratos de maior de 5000 mg kg⁻¹ e DL₅₀ dérmica aguda maior de 2000 mg kg⁻¹, sendo sensibilizadores cutâneos em porcos. Quando ingeridos em mamíferos são rapidamente metabolizados e excretados na urina e fezes (TOMLIN, 2000).

O clorotalonil está inserido na classe dos pesticidas aromáticos substituídos, sendo esta classificação arbitrária, uma vez que designa compostos derivados de benzeno que possuem propriedades fungicidas reconhecidas. Possui DL₅₀ oral aguda para ratos e dérmica aguda para coelhos igual a 10000 mg kg⁻¹ (LARINI, 1997, p.123). Segundo MATTERN *et al.* (1991), o clorotalonil está entre os 28 pesticidas registrados nos EUA, para os quais o Conselho de Pesquisa Nacional estimou o risco oncogênico para humanos. Fornece grande potencial carcinogênico em humanos, pois se ingerido em altas doses causa tumores no fígado em animais.

A deltametrina e a fenproprina são inseticidas sintéticos derivados estruturalmente de piretriniais naturais, possuem valores de DL₅₀ aguda oral em ratos

de 135 a 5000 mg kg⁻¹, dependendo das condições do estudo, para deltametrina e de 70,6 e 66,7 mg kg⁻¹ para camundongos machos e fêmeas, respectivamente, para fenproprina (TOMLIN, 2000). Grupo amplamente empregado na agricultura para proteção de frutos e grãos, na medicina veterinária para eliminação de ectoparasitas, em campanhas de saúde pública para erradicação de mosquitos e em uso doméstico para eliminação de insetos em geral, são apontados pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos como possíveis desreguladores endócrinos em animais (DALSENER, 2002). Pouco tóxicos para mamíferos e altamente tóxicos para insetos e peixes, não são considerados pesticidas persistentes no meio ambiente, sendo degradados através de reações de hidrólise e oxidação (PESTICIDAS Y PLAGUICIDAS, 2005).

Já o clorpirifós é um inseticida de amplo espectro, moderadamente tóxico a humanos. Pertencente a família dos organofosforados, possui DL₅₀ oral aguda em ratos de 135 a 163, porcos de 504 e coelhos de 1000 a 2000 mg kg⁻¹ (TOMLIN, 2000). No caso de ingestão acidental, podem ser afetados o sistema nervoso central, o sistema cardiovascular e o sistema respiratório. Irritante para pele e olhos, o clorpirifós é eliminado principalmente pelos rins (90%) e fezes (10%), sendo acumulado em tecidos adiposos, com meia-vida de 62 h (PESTICIDAS Y PLAGUICIDAS, 2005).

2.6. Limite Máximo de Resíduos

A Legislação Brasileira, através da ANVISA, define como LMR a quantidade máxima de resíduos de pesticidas legalmente aceita nos alimentos, decorrente da aplicação adequada de um produto numa fase específica da cultura, desde sua produção até o consumo, sendo expresso em mg da substância por kg de amostra (BRASIL, 1998). O objetivo principal do estabelecimento de LMRs é a garantia, com certa margem de segurança, que a população, ao consumir diariamente produtos cujos níveis de resíduos de pesticidas estejam dentro dos limites estabelecidos, não deverá, segundo os conhecimentos científicos atuais, ter algum problema de saúde (RIPLEY *et al.*, 2000).

Considerando as diferenças existentes entre as várias regiões do mundo em relação aos diferentes hábitos alimentares da população, o JMPR (do inglês, *Joint*

FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues), órgão assessor independente do CCPR (do inglês, *Codex Committee on Pesticide Residues*), dividiu o planeta em cinco áreas com dietas regionais distintas: África, Américas, Europa, Oriente Médio e Extremo Oriente, de modo a calcular o risco à saúde em que as pessoas podem estar submetidas ao ingerir alimentos contaminados com resíduos de pesticidas dentro dos limites estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* (CODEX ALIMENTARIUS, 2005).

Assim, são estabelecidos valores de ingestão diária aceitáveis (IDA), obtidos pelo JMPR, através de uma revisão completa das informações disponíveis providas de estudos com animais de laboratório e observações em humanos (dados de propriedades bioquímicas, metabólicas, farmacológicas e toxicológicas do pesticida). A IDA, também referido nos Estados Unidos como RfD (do inglês *reference dose*) ou cPAD (do inglês *chronic population adjusted dose*) representa a quantidade de uma substância que pode ser ingerida diariamente, por toda a vida, sem que ocorra risco apreciável ao consumidor com base nos dados conhecidos quando avaliado (CALDAS & SOUZA, 2000).

A importância dos LMRs do *Codex* para o comércio internacional adquiriu maiores dimensões desde o ano de 1995, com a entrada em vigor do acordo sobre a aplicação de medidas sanitárias e fitossanitárias da Organização Mundial do Comércio. O acordo está baseado em normas, diretrizes e recomendações da Comissão do *Codex Alimentarius* que devem ser aceitas e seguidas por seus 167 Estados Membros (CODEX ALIMENTARIUS, 2005).

Atualmente, vários obstáculos têm sido enfrentados pelos Estados Membros que vêm dificultando a harmonização de seus LMRs com os estipulados pelo *Codex Alimentarius*. Assim, como se pode ver na Tabela 5, o Brasil possui valores de LMR que diferem dos listados no *Codex Alimentarius*, em determinadas culturas, havendo até casos em que não existam limites nacionais ou estes limites, para determinados pesticidas, ainda não estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*. Estas diferenças de valores podem ser resultantes de diversos fatores, tais como a definição de resíduo, das boas práticas agrícolas, da diferença no ponto (colheita, comercialização ou no momento do consumo) em que se avalia o LMR (CALDAS & SOUZA, 2000).

Tabela 5. LMRs estabelecidos pela Legislação Brasileira, União Européia (UE) e *Codex Alimentarius*.

Pesticida	Brasil (mg kg ⁻¹)			UE (mg kg ⁻¹)			Codex (mg kg ⁻¹)		
	Morango	Maçã	Uva	Morango	Maçã	Uva	Morango	Maçã	Uva
Azoxistrobina	0,3	n.c.	0,2	2,0	0,05	2,0	n.c.	n.c.	n.c.
Captana	n.c.	25,0	2,0	3,0	3,0	3,0	20,0	25,0	n.c.
Clorotalonil	n.c.	n.c.	n.c.	3,0	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Clorpirifós	n.c.	n.c.	n.c.	0,2	0,5	0,5	n.c.	1,0	1,0
Cresoxim metílico	n.c.	0,2	0,5	0,2	0,2	1,0	n.c.	n.c.	n.c.
Deltametrina	n.c.	0,02	n.c.	0,05	0,1	0,1	0,05	n.c.	0,05
Fenpropatrin	2,0	5,0	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	5,0
Iprodiona	2,0	5,0	1,0	10,0	10,0	10,0	10,0	n.c.	10,0
Procimidona	3,0	2,0	3,0	5,0	0,02	5,0	10,0	n.c.	5,0

n.c. =Pesticida não encontrado na listagem de princípios ativos permitidos para esta cultura.

Fonte: BRASIL (2003), CODEX (2004) e COMISSÃO EUROPEIA (2005)

2.7. Procedimentos analíticos para determinação de pesticidas em frutas

A determinação de contaminantes orgânicos em alimentos e/ou amostras biológicas envolve geralmente etapas de isolamento dos compostos de interesse na matriz da amostra, a remoção de substâncias coextraídas do extrato obtido seguida da identificação e quantificação dos analitos desejados (HAJSLOVA *et al.*, 2003).

Dentre os procedimentos de extração mais utilizados para frutas encontram-se extrações com solvente, extração utilizando fase sólida (SPE, do inglês *solid-phase extraction*) e dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) (CHU *et al.*, 2005). Porém, a presença de interferentes provindos da matriz no extrato pode resultar na ocorrência de falsos positivos ou quantificações inexatas, além de aumentar valores de detecção para o método utilizado, necessitando assim etapas adicionais para a purificação do extrato obtido (COLUMÉ *et al.*, 2001, STAJNBAHER & ZUPANCIC-KARALJ, 2003 e FRENICH *et al.*, 2004). Dentre os procedimentos de purificação mais empregados destacam-se o uso de SPE, MSPD, cromatografia por permeação em gel (GPC, do inglês *gel permeation chromatography*) e microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid-phase microextraction*).

Diversos métodos analíticos foram publicados para determinação de resíduos de pesticidas em várias matrizes, onde se utilizam detectores específicos à dada propriedade dos compostos de interesse, sendo mais recentemente utilizada a espectrometria de massas (MS) para confirmação e/ou análise destas substâncias (CHU *et al.*, 2005).

A partir da década de 1970, surgiram diversos métodos para determinação multirresíduo, devido ao fato de permitirem a múltipla análise de diferentes pesticidas em cada análise, proporcionando assim economia de custos e tempo (HAJSLOVA *et al.*, 2003 e ALBERO *et al.*, 2005). Dentre estes, a cromatografia a gás (GC, do inglês *gas chromatography*) e a cromatografia a líquido (LC, do inglês *liquid chromatography*), associadas a diversos detectores, são as técnicas mais utilizadas para estas análises (VIDAL *et al.*, 2002).

Porém, com o crescimento drástico nos últimos anos do número de novos compostos que não podem ser determinados por GC por sua baixa volatilidade, alta polaridade e instabilidade térmica, o uso da cromatografia líquida vem sendo intensificado para complementar as análises multirresiduais e, com o acoplamento ao MS, têm se mostrado como uma ferramenta muito útil na análise de matrizes complexas. Pesticidas pertencentes às classes das carboxamidas, quinazonas, fenoxipirazóis, estrobilurinas, pirimidina, triazóis, carbamatos, neonicotinóides e morfolinás são representantes destas novas moléculas recentemente introduzidas para uso na agricultura (SANNINO *et al.*, 2004).

2.7.1. Métodos de extração e purificação

Devido aos baixos níveis de detecção requeridos pelos órgãos regulamentadores e a natureza complexa das matrizes em que os compostos alvo estão presentes, uma preparação eficiente da amostra, além de níveis traço de detecção e identificação são necessários (STAJNBAHER & ZUPANCIC-KARALJ, 2003).

Métodos utilizados para determinar resíduos de pesticidas em frutas e vegetais são principalmente baseados na partição líquida com solventes usualmente seguidos por extração em fase sólida como um passo de purificação (ALBERO *et al.*, 2004).

A extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid-liquid extraction*) é um procedimento clássico de extração de pesticidas em diferentes matrizes, sendo a técnica mais utilizada por vários métodos oficiais, para análise de frutas e vegetais, sendo recomendado pela AOAC (do inglês *Association of Official Analytical Chemists*) na análise deste tipo de matriz (HOFF & ZONEN, 1999).

Metanol, acetonitrila, acetona, diclorometano e acetato de etila são comumente os solventes de extração mais utilizados em métodos de análise multirresíduos para determinação de pesticidas em alimentos. Além disso, freqüentemente são utilizados como solventes de eluição em SPE quando empregados na extração de pesticidas em amostras de água e durante as etapas de purificação de extratos. Quando envolvidos nas etapas de purificação pós-extração de amostras (sós ou em uma mistura com outros solventes), ou quando nenhuma etapa é necessária, eles também constituem meio no qual o extrato final é dissolvido. Idealmente, nenhuma etapa de troca de solventes e/ou concentração de extratos é necessária e o extrato final é diretamente injetado no sistema cromatográfico, muitas vezes utilizando injeções de grandes volumes (LVI, do inglês *Large Volume Injection*) a fim de compensar a concentração mais baixa do analito. Devido aos custos e as complicações envolvidas com o uso de LVI, atualmente vem sendo empregados procedimentos de concentração dos extratos acompanhados ou não de troca solventes antes da análise cromatográfica, dentre os quais tolueno, isoctano, e hexano são os mais populares (HOFF & ZONEN, 1999 e MAŠTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004).

Utilizando o procedimento de extração recomendado pela AOAC (método oficial 998.01), PANG *et al.* (2000) identificaram e quantificaram resíduos de 8 piretróides em trigo, laranja e tomate por GC-ECD e GC-MS. A extração das amostras foi realizada com acetona, em ultra-turrax, sendo o extrato posteriormente filtrado em papel filtro, particionado com hexano e solução aquosa 4% de cloreto de sódio. O sobrenadante foi coletado e seco em coluna de sulfato de sódio anidro, evaporado por duas vezes em rotaevaporador a securo e reconstituído primeiramente com acetonitrila e após a segunda evaporação com hexano. Colunas de florasil foram utilizadas para a purificação do extrato final, sendo este finalmente injetado no sistema cromatográfico. A faixa de concentração trabalhada variou de 0,091 a 2,0 mg kg⁻¹, com coeficientes de determinação de 0,988 a 0,996, e limites de detecção

(LOD) de 0,01 a 0,08 e de 0,02 a 0,1 mg kg⁻¹ para GC-ECD e GC-MS, respectivamente.

Já STENSVAND & CHISTIENSEN (2000) investigaram resíduos de 9 fungicidas em morangos cultivados em estufas. As amostras de morango foram extraídas com mistura 1:1 (v/v) de acetona/éter de petróleo, em presença de sulfato de sódio anidro, sendo uma alíquota do extrato evaporada a secura e reconstituída com mistura 3:7 (v/v) de acetona/isooctano (concentração de 2 vezes). A análise dos compostos foi realizada por GC-ECD, GC-NPD e HPLC-UV (para imazalil). Os limites de quantificação (LOQ) foram de 0,05 mg kg⁻¹, exceto para os pesticidas triadimenol (0,04 mg kg⁻¹), penconazole (0,02 mg kg⁻¹) e triadimefon (0,02 mg kg⁻¹), sendo que as recuperações obtidas variaram de 84 a 113%, com desvio padrão relativo (RSD) inferiores a 8,6%. A degradação dos fungicidas foi acompanhada durante 14 dias e constatou-se que os fungicidas tolifluanida, clorotalonil e triadimefon necessitam maior tempo de carência para a coleta ou redução dos níveis de concentração aplicados.

CHRISTENSEN & GRANBY (2001) validaram um método para a determinação de 3 fungicidas da família das estrobilurinas em trigo, maçã e uva. Utilizando extração com acetona em ultra-turrax, seguida de partição com mistura 1:1 (v/v) de acetato de etila/cicloexano, em presença de sulfato de sódio anidro, o extrato obtido foi evaporado a secura sob fluxo de nitrogênio e reconstituído com a mistura de partição, obtendo-se concentração de 12,5 vezes. Então, utilizou-se GPC para purificação do extrato concentrado, injetando-se em seguida o mesmo no sistema cromatográfico para análise (GC-ECD, GC-NPD e GC-MS para confirmação). Devido ao fato da resposta dos detectores serem afetadas pela presença de coextrativos da amostra, utilizaram-se extratos “brancos” das matrizes para confecção das soluções analíticas, sendo a faixa de concentração utilizada para a obtenção das curvas compreendida entre 0,01 e 1,0 mg L⁻¹, com coeficientes de determinação superiores a 0,9967. As recuperações obtidas para os pesticidas azoxistrobina, tifloxistrobina e cresoxim metílico variaram de 70 a 110% e obtiveram-se LODs de 0,004 a 0,014 mg kg⁻¹, para as três estrobilurinas.

Utilizando o método de extração desenvolvido por Luke (LUKE *et al.*, 1975) SAFI *et al.* (2002) monitoraram resíduos de pesticidas em frutas e vegetais. O procedimento de extração das amostras foi realizado com acetona, em ultra-turrax, seguida de partição com éter de petróleo e diclorometano. O extrato obtido foi

evaporado a secura sob fluxo de nitrogênio e reconstituído com mistura 9:1 (v/v) de isoctano/acetona (concentração de 25 vezes do extrato), sendo levado a posterior análise por GC-NPD, ECD e MS para confirmação dos compostos. Foram confirmados resíduos de α e β endosulfan, clorpirifós, carbofuran, clorfluazuron, triadimenol I e II, penconazole, metabólitos de captafol, pirimetanil e iprodiona em algumas das 45 amostras de pepino, tomate e morango analisadas, sendo as amostras de morango as mais sujeitas a contaminação.

FRENICH *et al.* (2004) desenvolveu um procedimento, com extração por acetato de etila em presença de sulfato de sódio, para monitoramento multiclasse de 31 pesticidas em frutas frescas e vegetais (vagens, pepino, pimenta, tomate, berinjela, melancia, melão e abobrinha). Após extração com solvente em ultra-turrax, o extrato foi concentrado 8 vezes por evaporação e injetado no sistema LC-MS-MS. Com este procedimento, alcançaram-se recuperações de 72 a 105% nos dois níveis de fortificação avaliados, que variaram de 9,0 a 250 ng g⁻¹ dependendo do pesticida. A faixa linear estendeu-se de 7,0 a 750,0 ng g⁻¹ para os pesticidas estudados, com coeficientes de determinação variando de 0,984 e 0,999. Os LODs e LOQs obtidos para os pesticidas estudados encontraram-se dentro das faixas de concentração de 0,011 a 6,4 µg kg⁻¹ e de 0,089 a 21,0 µg kg⁻¹, respectivamente.

Nos últimos anos, novos procedimentos de extração têm sido desenvolvidos para transpor inconvenientes causados pelo uso de grandes quantidades de vidrarias e solventes tóxicos utilizados nos métodos clássicos de extração. Com este propósito, muitos procedimentos baseados na extração em fase sólida (SPE), dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), microextração em fase sólida (SPME), e extração assistida por microondas (MAE, do inglês *microwave-assisted extraction*) tem sido utilizados (ALBERO *et al.*, 2004).

O uso de material sorbente sólido para extrair analitos de uma solução foi introduzido nos anos 1980 e atualmente é amplamente utilizado em muitos tipos de matrizes, inclusive em alimentos. Um sorbente com forte afinidade para determinados analitos reterá e concentrará estes compostos provindos da solução contendo a amostra.

A SPE está sendo amplamente utilizada em análises de alimentos, principalmente como etapa de purificação do extrato. Colunas de extração de fase sólida contendo suporte de fase normal (polar) ou reversa (apolar) não oferecem simplesmente o potencial de simplificação da purificação do extrato inicial pela

redução da quantidade de solvente consumida, mas também a possibilidade de automação e utilização de grandes quantidades de amostra a fins de concentração de analitos (BULDINI *et al.*, 2002).

JIMÉNEZ *et al.* (2001) utilizaram-se SPE para a extração de 37 pesticidas de diferentes polaridades em vinho. O método desenvolvido combina a extração utilizando cartuchos poliméricos (Oasis[®]), eluição com acetato de etila, purificação do extrato em colunas de florisil e determinação cromatográfica por GC-ECD e NPD. Para evitar efeitos provindos da matriz, testaram-se solventes para lavagem dos cartuchos poliméricos, sendo a mistura 9:1 (v/v) de água/2-propanol a que apresentou melhores resultados. As faixas lineares para os pesticidas em estudo variaram de 0,5 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, com coeficientes de correlação (r^2) de 0,98 a 0,9999. Os valores de LOD obtidos para os pesticidas em estudo variaram de 0,05 a 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, não apresentando diferenças significativas entre as diferentes variedades de vinho testadas (tinto, branco e rosé).

STAJNBAHER & ZUPANCIC-KARALJ (2003), utilizando SPE, determinaram resíduos de 90 pesticidas em maçã, laranja e vagem com detecção por GC-MS. Os resíduos foram extraídos com acetona em ultra-turrax e posteriormente diluídos em água, purificados e concentrados por SPE. Foram testados cartuchos de C18 e poliméricos LiChrolut EN para o purificação, e a utilização de colunas de troca aniônica fraca DEA para remover traços remanescentes de interferentes no eluato. Obtiveram-se recuperações superiores a 80 % para a maioria dos compostos utilizando cartuchos poliméricos e LOQs de 0,01 mg kg^{-1} para a maioria dos compostos analisados, exceto para os pesticidas captana, diclofol, malaoxom, paraoxom metílico e paraoxom etílico com LOQs de 0,02 mg kg^{-1}

Em ALBERO *et al.* (2005) desenvolveu-se um método multirresíduo baseado na extração em fase sólida para determinação de 50 pesticidas em sucos comerciais. O procedimento de extração foi realizado em colunas de C18, pré-condicionadas com acetonitrila e água, após adição de metanol às amostras de suco, seguida de eluição com mistura 1:1 (v/v) de acetato de etila/hexano. O extrato foi concentrado sob fluxo de nitrogênio a 1 mL e injetado no GC-MS, no modo SIM de operação. As soluções analíticas foram preparadas em extrato de suco “branco” para compensar o efeito matriz observado, obtendo-se curvas analíticas com coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,996 para a faixa de concentração trabalhada (0,02 a 0,2 mg L^{-1}). A média de recuperações foi superior a 91%, com

RSD \leq 9% entre as análises, alcançando-se LODs de 0,1 a 4,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ com o método proposto. Realizou-se a aplicação do procedimento em 12 amostras de suco comerciais onde diazinon, procimidona e etion foram os pesticidas encontrados em 6 destas, porém em níveis de concentração muito baixos.

A extração utilizando MSPD está baseada na dispersão da amostra em um adsorbente, como florisil[®], C18, alumina, ou sílica, permitindo assim a extração e purificação dos analitos em um único passo. A dispersão em amostras sólidas é previamente feita em recipiente fechado, onde são homogeneizados e então a mistura é transferida para as colunas de extração. No caso de amostras líquidas, a dispersão da matriz no adsorbente pode ser feita diretamente nas colunas de extração (ALBERO *et al.*, 2004).

NAVARRO *et al.* (2002) descreve a aplicação de MSPD para determinação de 8 novos pesticidas em frutas e vegetais. O método desenvolvido utilizou C8 como sorbente para a extração nas matrizes, seguida de extração desta mistura com acetato de etila e purificação com colunas de sílica. O extrato obtido foi levado à análise cromatográfica por GC-ECD, GC-NPD e GC-MS, no modo SIM para confirmação dos compostos. As faixas lineares se estenderam de 0,01 a 10 mg kg^{-1} , com coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,994. Recuperações de 80 a 102% foram obtidas, exceto para os compostos captana (78%) e folpet (79%), com RSD médio de 9%. Os valores de LODs calculados e LOQs variaram de 0,003 a 0,03 mg kg^{-1} e de 0,01 a 0,1 mg kg^{-1} para todas as culturas em análise.

Em GIZA & SZTWIERTNIA (2003) utilizou-se MSPD para extração e purificação dos pesticidas azoxistrobina e tifloxistrobina em extratos de maçã, com determinação por GC-ECD e GC-NPD. Para análise dos fungicidas, a polpa de maçã foi misturada com sílica gel 60 e esta mistura foi acondicionada em colunas de vidro, sendo os analitos extraídos com mistura 9:1 (v/v) de diclorometano/acetona. O extrato obtido foi evaporado a secura, redissolvido em acetona e injetado no sistema cromatográfico. Obtiveram-se recuperações de 72 a 106,1% para ambos compostos nas fortificações efetuadas (0,01 a 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$) e LODs de 0,01 e 0,02 mg kg^{-1} para tifloxistrobina e azoxistrobina, respectivamente.

Já ALBERO *et al.* (2004) investigou resíduos de 15 herbicidas em sucos de frutas com o uso de MSPD para extração e detecção por GC-MS. O procedimento analítico se baseou dispersão de 2 g de Florisil em de 1 mL de suco, os quais foram acomodados em colunas de vidro e extraídos com acetato de etila, sob sonicação.

Após a extração, o solvente foi filtrado e concentrado 2,5 vezes. As recuperações obtidas variaram de 82 a 115% com RSD entre as análises inferior a 10%. Com este procedimento alcançaram-se valores de LOQ de 0,3 a 5,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ e o mesmo foi aplicado na análise de amostras comerciais de sucos.

Desde sua introdução, no início dos anos 1990, a SPME tem ganhado popularidade como uma ferramenta simples, livre de solventes, confiável e flexível para a amostragem de uma variedade de compostos voláteis e semivoláteis (NAVALÓN *et al.*, 2002 e SANUSI *et al.*, 2004).

A SPME tem sido extensivamente utilizada para a extração direta de pesticidas em amostras aquosas. A fim de evitar problemas oriundos de interferências coextraídas das matrizes, adotou-se a suspensão da fibra, HS-SPME (do inglês *headspace solid-phase microextraction*), como alternativa por não entrar em contato com a matriz homogeneizada. Porém, a HS-SPME somente se mostrou eficiente para compostos com coeficientes de Henry médios para altos, necessitando de partição dos compostos de interesse e aquecimento para promover a transferência de massas de analitos semivoláteis (ZAMBONIM *et al.*, 2002, SANUSI *et al.*, 2004 e WHEI & JEN, 2003).

Nesta última década, a energia proporcionada pelo uso de microondas foi investigada na química analítica como forma de acelerar a digestão das amostras, a extração, e também em reações químicas. Pela rotação de dipolo e condutância iônica de substâncias polares ou espécies iônicas sob a irradiação de microondas, ocorre elevação na temperatura do sistema, num curto período de tempo, o que vem a complementar a SPME na amostragem de compostos orgânicos (WHEI & JEN, 2003).

LAMBROPOULOU & ALBANIS (2003) utilizando HS-SPME e GC-MS identificaram e quantificaram 7 pesticidas organofosforados em morangos e cerejas. Alíquotas de 5 g das amostras foram homogeneizadas em ultra-turrax com a proporção 1:2 e 1:3 (m/v) de água para morango e cereja, respectivamente. Em seguida foram submetidas a aquecimento por 10 min a 70 °C, em recipiente fechado, e extraídas com exposição à fibra de poli-dimetilsiloxano (100 μm) por 45 min, sendo a dessorção realizada diretamente no sistema cromatográfico (a 240 °C por 5 min). Os LODs tanto para morango quanto para cereja foram de 13 $\mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto que os valores de LOQ variaram de 17,3 a 41,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, quando utilizado o modo SIM.

Já em SANUSI *et al.* (2004) combinou-se um procedimento de extração empregando SPME e extração assistida por microondas para análise de resíduos de piretróides em morangos por GC-MS. Primeiramente, os analitos foram desorvidos das frutas inteiras através de imersão em solução aquosa de acetonitrila (50%), assistida por microondas, não havendo assim coextração de interferências (substâncias endógenas). Então, expôs-se a fibra de poli-dimetilsiloxano (100 µm) por 30 min a solução obtida e levou-se a desorção e determinação cromatográfica. Foram obtidos com este método LODs e LOQs de 14,0 e 40,0 µg kg⁻¹, respectivamente, para os compostos em estudo. Os resultados obtidos com o método desenvolvido foram comparados e comprovados com os obtidos por dois laboratórios comerciais renomados, que utilizavam métodos tradicionais.

2.7.2. Determinação cromatográfica

A técnica mais freqüentemente usada para análise de pesticidas em frutas é a cromatografia a gás (GC, do inglês *gas chromatography*) com diferentes sistemas de detecção seletivos a determinados grupos funcionais presentes nas moléculas destes, tais como ECD, detecção de nitrogênio e fósforo (NPD, do inglês *nitrogen-phosphorus detection*), e por fotometria de chama (FPD, do inglês *flame photometry detector*). A confirmação de identidade do resíduo normalmente é executada através de espectrometria de massas (MS) usando o modo de monitoramento de um único íon (SIS, do inglês *Selected Ion Storage*) (ALBERO *et al.*, 2005), como descrito por COLUMÉ *et al.* (2000), COLUMÉ *et al.* (2001), NAVARRO *et al.* (2002), SANNINO *et al.* (2003) e HERCEGOVÁ *et al.* (2004) .

Porém, há uma crescente tendência na utilização de GC-MS para análise de amostras complexas, por sua universalidade de detecção e confiabilidade de resposta (ALBERO *et al.*, 2004 e ARREBOLA *et al.*, 2003) como se pode ver em UENO *et al.* (2004) e CHU *et al.* (2005). Alguns autores recomendam o uso do modo *full scan* para análises multirresiduais porém este modo apresenta certas limitações em relação à sensibilidade, principalmente quando aplicado à determinação em matrizes com muitos interferentes associados a concentrações muito baixas dos analitos de interesse. O aumento da seletividade da técnica e conseqüentemente, o

aumento da sensibilidade têm se obtido com o emprego do modo SIM de varredura, onde ocorre uma discriminação entre os compostos alvo e os interferentes, diminuindo assim valores de LOD e LOQ do método, porém com considerável decréscimo na quantidade de informações geradas em relação ao modo *full scan* (ARREBOLA *et al.*, 2003).

Recentemente, algumas aplicações utilizando GC acoplada à espectrometria de massas seqüencial (MS-MS) para determinação de pesticidas em frutas e vegetais têm sido descritas na literatura (ORTELI *et al.*, 2004). VIDAL *et al.* (2002) que determinou através de GC-MS-MS resíduos de 31 pesticidas, utilizando diclorometano como solvente de extração, e em ARREBOLA *et al.* (2003) que desenvolveu um método utilizando GC-MS-MS para determinação de 81 pesticidas multiclasse, utilizando diclorometano com solvente de extração das amostras.

Dentre os métodos analíticos usados em análises de resíduos, a cromatografia líquida (LC) com detecção por arranjo de diodos (DAD, do inglês *diode-array detection*) é efetiva para a determinação de compostos termicamente lábeis e não voláteis. Porém, com o acoplamento da cromatografia a líquido com detectores por espectrometria de massas (LC-MS) ou com espectrometria de massas seqüencial (LC-MS-MS) esta técnica vêm sendo gradualmente utilizada, tornando-se uma técnica poderosa para a identificação e quantificação de resíduos de pesticidas em alimentos (MOL *et al.*, 2003 e ALBERO *et al.*, 2005).

Até o presente momento, poucos métodos multirresíduos utilizando LC-MS-MS para a determinação de pesticidas têm sido descritas (ORTELI *et al.*, 2004), tais como em BLASCO *et al.* (2002) que desenvolveu um método utilizando LC com ionização química a pressão atmosférica (APCI, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*) e detecção por MS-MS para determinação de 5 pesticidas em frutas e vegetais utilizando MSPD para preparação das amostras. Também na determinação em frutas, AGÜERA *et al.* (2004) relata um método multirresíduo para determinação simultânea de 16 pesticidas multiclasse por LC-MS-MS, com ionização por eletrospray (ESI, do inglês *electrospray ionization*), utilizando acetato de etila, em meio alcalinizado com hidróxido de sódio, como solvente de extração. De modo similar, um método multirresíduo para análises de pesticidas polares foi desenvolvido por ORTELLI *et al.* (2004) para determinação de 74 pesticidas por LC-MS-MS, com ionização ESI, em frutas e vegetais, como método suplementar na determinação por GC.

2.7.3. Métodos multirresíduos em frutas e outras matrizes

Uma tendência moderna nos métodos multirresíduos está se direcionando para o desenvolvimento de procedimentos capazes de determinar tantos compostos quanto possível, num intervalo curto de tempo e de maneira mais precisa possível (GELSONINO *et al.*, 1997). Porém, o desenvolvimento de métodos multirresíduos é difícil e trabalhoso devido ao fato de envolver compostos com diferentes polaridades, solubilidades, volatilidades e distintos valores de pK_a numa extração e análise conjunta (STAJNBAHER & ZUPANCIC-KARALJ, 2003).

Muitos métodos multirresíduos para determinação de pesticidas organofosforados, organoclorados e organonitrogenados em alimentos utilizam a cromatografia a gás para a separação individual dos compostos, seguida pela determinação com detectores seletivos e específicos, tais como ECD, NPD, FPD e MS (COLUMÉ *et al.*, 2000, COLUMÉ *et al.*, 2001, STAJNBAHER & ZUPANCIC-KARALJ, 2003 e ALBERO *et al.*, 2005).

O emprego de GC-ECD é a técnica mais favorável para a determinação da maioria dos pesticidas por sua alta sensibilidade e seletividade, sendo a confirmação da identidade do resíduo realizada por GC-MS (GELSONINO *et al.*, 1997).

Usando esse princípio, COLUMÉ *et al.* (2001) determinou resíduos de 25 pesticidas, dentre eles 16 piretróides e 9 organoclorados, em vegetais liofilizados. A extração do material liofilizado foi realizada com hexano, sob agitação mecânica, seguida de purificação num sistema semi-automatizado de SPE, utilizando cartuchos com sílica com eluição por acetato de etila. Os extratos obtidos foram analisados por GC-ECD e os compostos confirmados por GC-MS. Obtiveram-se curvas analíticas com coeficientes de correlação de 0,996 a 0,999, com RSD de 4,0 a 6,8%, para as faixas de trabalho de 5,0 a 200 e 100 a 2000 $ng\ g^{-1}$, respectivamente. Os valores de LODs obtidos variaram de 1,0 a 10,0 $ng\ g^{-1}$, exceto para os pesticidas captana e lindano, com LOD de 30 $ng\ g^{-1}$. O procedimento foi aplicado em 100 amostras frescas de batata, tomate, espinafre, pepino, pimentão, couve-flor, cebola e berinjela onde foram encontrados resíduos em 10 destas, de diclofuanida e bifentrina.

SANNINO *et al.* (2003) utilizaram um método multirresíduo para determinação de 12 piretróides, dentre eles fenpropatrina e deltametrina, em purê de tomate, pêssego, suco de laranja e ervilhas em lata. Utilizando um procedimento de extração

miniaturizado com acetona em ultra-turrax e partição com mistura 1:1 (v/v) de acetato de etila/hexano, o extrato final foi concentrado, sob vácuo, em torno de 4,5 vezes, e então purificado em colunas de florisil. A análise foi realizada tanto por GC-ECD quanto por GC-MS, no modo SIM, para confirmação. Estudos de recuperação obtiveram resultados de 70,2 a 96%, com RSD entre 4,0 e 13,9 %, para os dois níveis de fortificação, os quais variaram de 0,01 a 0,05 mg kg⁻¹. Quando utilizado GC-ECD, obtiveram-se LOQs de 0,005 a 0,05 mg kg⁻¹, enquanto que por GC-MS atingiram-se valores de 0,0025 a 0,02 mg kg⁻¹, sendo que nenhuma diferença significativa entre as quatro matrizes foi observada.

Em HERCEGOVÁ *et al.* (2004) relatou-se o uso de GC-ECD e GC-MS para a determinação de 18 pesticidas pertencentes a diferentes classes em maçãs, utilizadas para a fabricação de comida de bebês. Com extração feita com acetonitrila assistida por sonda de ultra-som, o extrato foi purificado por SPE, com cartuchos Bond Elut-NH₂ e injetado diretamente nos sistemas cromatográficos. As curvas analíticas foram construídas em extratos branco da matriz, compreendendo a faixa de concentração de 0,0125 a 2,5 µg mL⁻¹, apresentando r² de 0,9994 a 1, exceto para os pesticidas captana (0,9945) e cipermetrina (0,9771). Obtiveram-se recuperações maiores que 90%, exceto para os pesticidas dimetoato (77,7%) e captana (46,4%), sendo que os valores de LOQ calculados variaram de 2,9 a 31,1 µg kg⁻¹ e 0,07 a 18,8 µg kg⁻¹ para GC-ECD e GC-MS (modo SIM), respectivamente.

Porém, nos últimos anos, a análise por GC-MS vem sendo amplamente utilizada, se tornando-se uma ferramenta freqüente para a determinação e confirmação de multirresíduos em amostras complexas (SANNINO *et al.*, 2004).

Assim, utilizando GC-MS no modo SIM, UENO *et al.* (2004), investigaram resíduos de 89 pesticidas em frutas e vegetais. As amostras foram extraídas com acetonitrila sob agitação e o extrato obtido foi purificado por um passo de *salting-up*, seguido de redissolução em acetato de etila, e GPC com coluna grafitizada de carbono e coluna de sílica-gel/PSA, no qual os coextraídos foram removidos do extrato final. Obtiveram-se recuperações de 70 a 120% para 82 dos 89 pesticidas analisados, com RSD ≤ 5%. O método desenvolvido foi aplicado em 188 amostras comerciais de frutas e vegetais para demonstrar seu uso em análises de rotina, entre os quais foram detectados em 122 das mostras analisadas 63 diferentes resíduos de pesticidas, nos quais encontram-se clorotalonil, procimidona, captana, clorpirifós, iprodiona, fenpropatrina e azoxistrobina.

Em CHU *et al.* (2005) também foi empregado GC-MS, no modo SIM, para determinação simultânea de 266 pesticidas em sucos de maçã, utilizando MSPD para a extração. As amostras foram misturadas com terra diatomácea e acondicionadas em colunas de vidro, seguidas de eluição com mistura 1:1 (v/v) de hexano/diclorometano dos pesticidas desejados. O extrato foi concentrado 240 vezes, através de rota-evaporador a 40 °C, seguida de ajuste com fluxo de nitrogênio. Com este procedimento obtiveram-se recuperações de 63,8 a 116,8%, exceto para os pesticidas amitraz, bromociclen, clormefós, clortiamida, endotal, hexaclorobenzeno e metamidofós que foram inferiores a 60%. As curvas analíticas apresentaram coeficientes de correlação entre 0,98 e 1,0, numa faixa de concentração de 0,05 a 4,0 mg kg⁻¹, e os LODs variaram de 3,0 a 18,0 µg kg⁻¹. Foram avaliadas com este método 236 amostras de sucos produzidos na China em 2004, dos quais 9 apresentaram contaminação com resíduos de fenvalerato, deltametrina, imazalil e fenproprina.

A fim de complementar as análises por cromatografia a gás, novos métodos multirresiduais empregando a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS ou LC-MS-MS) têm sido desenvolvidos para este tipo de determinação (ORTELLI *et al.*, 2004 e SANNINO *et al.*, 2004).

Em TAYLOR *et al.* (2002) desenvolveu-se um método multirresíduo para determinação de 38 pesticidas em diferentes matrizes (uva, kiwi, morango, espinafre, limão, pêssego e nectarina) por LC-MS-MS. Através de extração direta das amostras com acetato de etila, em presença de sulfato de sódio anidro e bicarbonato de sódio, em ultra-turrax, e concentração de 5 vezes do extrato em rota-evaporador, obtiveram-se recuperações de 63 a 96%, com RSD ≤ 20%, para os compostos analisados. Com este procedimento chegou-se a valores de LOD de 0,005 a 0,8 µg mL⁻¹. As curvas analíticas obtidas na faixa de concentração trabalhada (0,01 a 1,6 µg mL⁻¹) apresentaram $r^2 \geq 0,99$ e foram construídas nos extratos das matrizes estudadas para compensar os efeitos destas.

SANNINO *et al.* (2004) desenvolveu e aplicou, em 100 amostras de produtos de frutas comerciais, um método para determinação simultânea de resíduos de 24 novos pesticidas, dentre eles azoxistrobina e cresoxim metílico, em purê de maçã, suco concentrado de limão e extrato de tomate. O procedimento de extração das amostras consistiu numa miniaturização da extração com solventes, onde as amostras foram extraídas com acetona, em ultra-turrax, seguida de partição com

mistura 1:1 (v/v) de acetato de etila/ cicloexano e concentração de 4,5 vezes do solvente final, não necessitando de etapas extras de purificação. A determinação foi realizada por LC-MS-MS, utilizando modo ESI de ionização, com 55 transições simultâneas MS-MS monitoradas, num tempo total de análise de 20 min. Obtiveram-se recuperações de 76 a 106% para os níveis de concentração fortificados (0,0001 a 0,2 mg kg⁻¹), com RSD ≤ 15%, exceto para o pesticida imidacloprid que teve recuperações inferiores a 50%. Na aplicação do procedimento desenvolvido, foram detectados resíduos de tebuconazole e tetraconazole em duas amostras analisadas.

2.8. Parâmetros cromatográficos

A seguir estão descritos os parâmetros cromatográficos empregados para avaliar a separação de analitos por cromatografia a gás.

2.8.1. Fator de retenção (k)

O fator de retenção é determinado pela razão entre a fração de tempo em que as moléculas do analito ficam retidas na fase estacionária e a fração em que percorrem a coluna na fase móvel, de acordo com a equação (1) (COLLINS, *et al.*, 1990; LANÇAS, 1993, PINTO, 1999):

$$k = \left(\frac{t_R - t_M}{t_M} \right) = \frac{t'_R}{t_M} \quad (1)$$

Onde:

t_R = tempo de retenção de um analito, que é o tempo transcorrido desde a injeção até o ponto máximo do pico;

t_M = tempo de retenção de um analito não retido;

t'_R = tempo de retenção ajustado.

Os valores ideais de k para dois componentes devem variar entre 1 e 10, e para múltiplos componentes são aceitos valores entre 0,5 e 20 (COLLINS, *et al.*, 1990; LANÇAS, 1993; PINTO, 1999).

2.8.2. Resolução (Rs)

A resolução refere-se à separação de dois picos adjacentes e pode ser obtida pela equação (2) (COLLINS, *et al.*, 2004; LANÇAS, 1993; PINTO, 1999):

$$R_s = 2 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{b1} + W_{b2}} \right) = 1,177 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{h1} + W_{h2}} \right) \quad (2)$$

Onde:

t_{R1} e t_{R2} = tempo de retenção de dois picos adjacentes;

W_{b1} e W_{b2} = largura dos picos na base, em unidades de tempo;

W_{h1} e W_{h2} = largura dos picos a meia-altura, em unidades de tempo.

Considera-se que: $R_s = 1$ tem-se 98% de separação; $R_s = 1,25$ tem-se 99,5% de separação e $R_s = 1,5$ tem-se 100% de separação para picos gaussianos (COLLINS *et al.*, 1990; LANÇAS, 1993; PINTO, 1999).

2.8.3. Fator de separação (α)

O fator de separação está relacionado com a separação de dois picos adjacentes, sendo calculado pela razão entre os respectivos fatores de retenção que são, por sua vez, relacionados aos tempos de retenção ajustados, conforme a equação (3):

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \quad (3)$$

O fator de retenção (k) mede a seletividade de um sistema cromatográfico e, portanto, quanto mais seletivamente a fase estacionária reter o segundo componente que está sendo analisado, maior será o fator de separação.

Se $\alpha = 1$, indica que não há diferença termodinâmica entre os dois componentes de um dado sistema e eles não podem ser separados. Contudo, quando $\alpha > 1$ indica que os dois picos estão totalmente separados, pois podem ser largos e estarem sobrepostos. Em consequência disto, um valor elevado de α só implica em boa separação se os picos forem estreitos (MARONEZE, 2004).

2.8.4. Curva de van Deemter

A curva de van Deemter é indicada, na caracterização cromatográfica de uma coluna, para determinar a vazão que se deve trabalhar a fim de obter a máxima eficiência (N) da coluna. Essa se relaciona com a velocidade linear ótima (μ), na qual a altura equivalente a um prato (H) terá um valor mínimo e, portanto o valor de eficiência será máximo. As equações para cálculo de N, H e μ são apresentadas a seguir (equações 4, 5 e 6, respectivamente), onde L representa o comprimento da coluna cromatográfica (CLIFON & MELOAN, 1996):

$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2 \quad (4)$$

$$H = \frac{L}{N} \quad (5)$$

$$\mu = \frac{L}{t_M} \quad (6)$$

2.9. Validação de procedimentos analíticos

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (RIBANI *et al.*, 2004). A variabilidade associada a um procedimento analítico, deve levar em consideração todas as incertezas do processo, incluindo aquelas atribuídas aos equipamentos, soluções de referência, calibrações, analista e ambiente (TOMLIN, 2000).

Na determinação de resíduos de pesticidas deve-se desenvolver métodos de extração eficientes, bem como procedimentos analíticos com alta seletividade, a fim de assegurar que, caso estes resíduos estejam presentes nas amostras analisadas, sejam possíveis a sua separação e quantificação (LANÇAS, 2004).

A validação de um procedimento que emprega técnicas cromatográficas pode ser considerada como a soma de diferentes etapas de validação a serem incluídas no processo analítico. Em geral, envolve a execução e a interpretação de uma série de experimentos planejados a fim de avaliar as características do procedimento. Desta forma, todas as variáveis devem ser consideradas, tais como a estratégia de amostragem, preparação da amostra, detecção e avaliação dos dados (ZANELLA *et al.*, 2000).

Os parâmetros analíticos normalmente utilizados para validação de métodos de separação são: curva analítica, linearidade, seletividade, recuperação, precisão, limites de detecção e de quantificação e robustez (CHASIN *et al.*, 1998).

2.9.1. Curva analítica

A calibração é um dos estágios fundamentais em análise química. A curva analítica é o método de quantificação mais freqüentemente utilizado e consiste na determinação da resposta de determinado instrumento às várias concentrações da substância em estudo (PRIMEL, 2003).

Cinco níveis de concentração, no mínimo, são sugeridos pelo Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP) e ANVISA para que seja construída

uma curva analítica, sendo injetados em ordem crescente de concentração, por no mínimo três vezes cada. Já a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*) recomenda seis ou mais níveis de concentração (RIBANI *et al.*, 2004).

Pode-se construir a curva analítica utilizando-se soluções analíticas de referência em solvente ou no extrato obtido com a matriz. A curva preparada em solvente relaciona o sinal do instrumento com a quantidade de analito, sem considerar a interferência da matriz. Para compostos polares, há uma intensificação na interferência da matriz, uma vez que estes compostos sofrem adsorção nos sítios ativos do sistema cromatográfico, como os grupos silanóis do insersor. Assim, SCHENCK e LEHOTAY (2000) recomendam a preparação das curvas analíticas no extrato das matrizes como forma de minimizar este efeito de adsorção, ou saturar os sítios ativos do sistema cromatográfico para compensação das respostas decorrentes deste tipo de interferência.

Para a maioria das técnicas analíticas cromatográficas, uma relação linear de primeira ordem é observada entre a resposta do detector (y) e a concentração (x) do analito em estudo, podendo ser descrita pela equação da regressão linear: $y = ax + b$, onde b é a intersecção com o eixo y (coeficiente linear) quando $x = 0$ e a é a inclinação da curva (coeficiente angular) (PIMENTEL & BARROS NETO, 1996).

2.9.2. Linearidade

Define-se linearidade como a capacidade de um método analítico gerar resultados proporcionais à concentração da espécie em análise, dentro de uma faixa analítica especificada, na qual é possível relacionar o valor de uma variável dependente (medida) através do conhecimento da variável independente (concentração) (CHASIN *et al.*, 1998).

A linearidade é determinada através da análise de uma série de soluções analíticas de diferentes concentrações, variando-se estas de acordo com a finalidade da análise (MISTURA, 2003).

Para verificar se os pontos encontram-se dentro da região linear da curva utiliza-se o teste da razão entre o sinal (S) e a concentração (Q), definida pela equação 7:

$$(S/Q)_i \% = \left(\frac{S_i - b}{Q_i} \right) \times 100/a \quad (7)$$

Onde: b = coeficiente linear; a = coeficiente angular.

Os valores de S e Q são obtidos na construção da curva analítica, através dos parâmetros de área ou altura do pico e concentração do analito.

Na ausência de erros indeterminados, isto é, com $r^2 = 1$, e dentro da faixa linear, pode-se provar que $(S/Q)_i = a$ para todos os pares de valores experimentais usados para construir a curva. Na presença de erros indeterminados ($r^2 < 1$), que é o que ocorre na prática, e dentro da faixa linear, $(S/Q)_i \approx a$. Se $(S/Q)_i \ll a$ ou $(S/Q)_i \gg a$, então o resultado pode ser assumido como fora da faixa linear. Conforme normas da União Internacional de Química Pura e Aplicada, (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*), são considerados dentro da faixa linear, os pontos cujas razões sinal/concentração não ultrapassam mais de 5% do coeficiente angular da reta (CLIFTON & MELOAN, 1996).

2.9.3. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

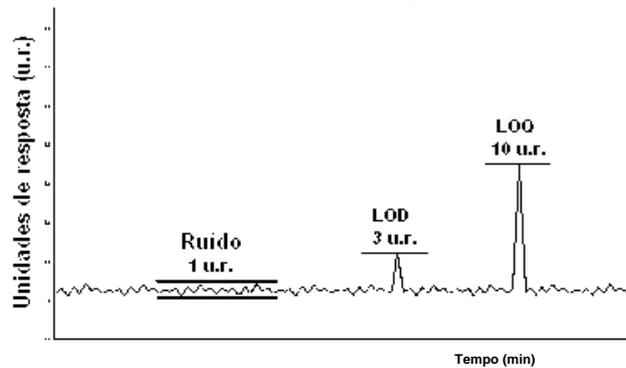
Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método (INMETRO, 2003).

O Limite de Detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. É geralmente expresso em unidades de concentração e definido como a relação de 2:1 ou 3:1 entre o sinal e o ruído (RIBANI, 2004).

Já o Limite de Quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível de precisão e veracidade (*trueness*). Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios-padrão. Na

prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração. (INMETRO, 2003).

Neste trabalho convencionou-se denominar como unidades de resposta (u.r.) as medidas realizadas para determinar os valores de LOD, LOQ e ruído da linha base, conforme desenho demonstrado pela Figura 5.



Fonte: MISTURA (2003), modificada de CLIFTON & MELOAN (1996).

Figura 5. Diagrama demonstrando o ruído da linha base, o LOD e o LOQ.

Assim, o ruído consiste na flutuação da linha base obtida no cromatograma sendo a diferença entre a maior altura e a maior profundidade dos picos, não relacionando a nenhum composto detectado. Com o tempo, o ruído pode mudar, e conseqüentemente o LOD e o LOQ. Assim, os instrumentos necessitam ser averiguados rotineiramente e os dados reportados de acordo com a variação em cada aquisição (CLIFTON & MELOAN, 1996).

2.9.4. Recuperação

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo (*spike*), em pelo menos três diferentes concentrações. A recuperação, em termos de porcentagem, é calculada segundo a equação (8) (INMETRO, 2003):

$$R (\%) = \frac{\text{massa obtida}}{\text{massa real}} \times 100 \quad (8)$$

2.9.5. Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. É expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*), calculado pela equação (9) (RIBANI *et al.*, 2004) e pode ser determinada em termos de repetitividade e precisão intermediária.

$$\text{RSD} = \frac{s}{X_m} \times 100 \quad (9)$$

onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto = $\{\sum(x_i - x_m)^2 / n - 1\}^{1/2}$;

x_i = valores individuais;

x_m = média de uma série de medidas (replicatas);

n = número de medidas.

A repetitividade representa o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, realizadas sob as mesmas condições de medição, denominadas condições de repetitividade, com o mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, no mesmo local e com repetições em curto intervalo de tempo (INMETRO, 2003)

Já a precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas, diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. Esta medida da precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados depois que esteja finalizado (RIBANI *et al.*, 2004).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho foram estudados alguns pesticidas comumente empregados na fruticultura, presentes em recomendações da Legislação Brasileira (ANVISA, 2005), Produção Integrada de Frutas (ABPM, 2005) ou de fácil acesso e/ou uso rotineiro pelos produtores. Para isso, foi desenvolvido um procedimento analítico onde se realizou a otimização da separação cromatográfica destes compostos, para sua determinação simultânea, a fim de se obter a melhor resolução e sensibilidade no menor tempo de análise possível. A determinação de pesticidas em frutas envolveu a otimização de métodos de extração e concentração destes analitos para tornar possível a sua detecção em níveis desejáveis nas matrizes de escolha. Posteriormente, procedeu-se à validação deste procedimento, e realizou-se a determinação dos pesticidas selecionados em morango, maçã e uva. Amostras obtidas em diferentes pontos do comércio local foram avaliadas em termo de teores de contaminação para os pesticidas em questão.

3.1. Reagentes, solventes e materiais

- Sulfato de sódio anidro, grau resíduo (Merck, Alemanha), previamente seco em mufla a 600 °C durante 4 h e mantido em estufa a 130 °C até utilização (CLIFTON e MELOAN, 1996);
- Florisil[®] para análise de resíduos de pesticidas, 60 a 100 mesh (Mallinckrodt, EUA) ativado a 677 °C por 3 h seguido de aquecimento por 168 h a 130 °C em mufla. Este é mantido em dessecador e deve ser reaquecido a 130 °C antes do uso (CLIFTON e MELOAN, 1996);
- Diclorodimetilsilano (Sigma-Aldrich, Alemanha);
- Metanol, tolueno, acetona, éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila e n-hexano grau resíduo - nanograde[®] (Mallinckrodt, EUA);
- Dispensador de solvente de 10 mL (Fortuna Optifix , Alemanha);
- Extran[®] neutro e alcalino (Merck, Brasil);
- Acetona p.a. (Belga, Brasil);
- Água destilada e deionizada;
- Água purificada (destilada, deionizada e purificada em sistema Milli-Q[®]);

- Frascos de teflon[®] de 20 e 100 mL, com tampa rosqueada;
- Cartuchos para SPE Strata C18-E, 500 mg/3 mL e SDB-L 500 mg/3 mL (Phenomenex, EUA).

As colunas utilizadas na purificação dos extratos foram confeccionadas em vidro borossilicato no Laboratório de Hialotecnica do Departamento de Química da UFSM.

3.2. Equipamentos

- Sistema GC-ECD: Cromatógrafo a Gás Varian 3800 (Varian, EUA) equipado com: amostrador automático (autosampler) Varian 8100; injetor 1079 modo split/splitless com insersor (*liner*) de vidro silanizado, diâmetro interno (d.i.) de 0,5 e 2 mm; detector por captura de elétrons, isótopo ⁶³Ni; sistema de aquisição de dados através do Workstation Star 4.5 (Varian, EUA);
- Coluna capilar DB-5 (5% fenil e 95% metilpolisiloxano) de sílica fundida, 30 m de comprimento, 0,25 mm d.i. e 0,25 µm de espessura do filme (J & W Scientific[®], EUA);
- Sistema GC-MS: Cromatógrafo a Gás Varian 3400 (Varian, EUA) equipado com: amostrador automático (autosampler) Varian 8200CX; injetor SPI (*septum-equipped programmable inject*) modo *splitless* com insersor (*liner*) de vidro silanizado, diâmetro interno (d.i.) de 2 mm e coluna capilar VF- 5MS (5% fenil e 95% metilpolisiloxano), modelo CP 9012, *Factor Four/MS* (Varian, EUA) de sílica fundida, 30 m de comprimento, 0,25 mm d.i., 0,25 µm de espessura do filme, com 5 m de EZ-Guard[®] (coluna capilar não recoberta por fase estacionária)(Varian, EUA); detector Espectrométrico de Massas Saturn 2000 (Varian, EUA); sistema de aquisição de dados através do Workstation Star 5.0 (Varian, EUA);
- Controlador eletrônico de fluxo (EFC, do inglês *Electronic Flow Control*) (Varian, EUA);
- Balança analítica de precisão, com quatro casas decimais, modelo AG 245 (Mettler Toledo, Suíça);

- Balança analítica, com duas casas decimais, modelo PE 1600 (Mettler Toledo, Suíça);
- Micropipetadores automáticos de capacidade variável (Brand, Alemanha e Eppendorf, Canadá);
- Estufa de circulação de ar (Leybold-Heraeus, Alemanha)
- Mufla (Heraeus[®] Instruments, Alemanha);
- Centrífuga, modelo G-412 (Jouan, França);
- Ultra-turrax Polytron, modelo PT-3100 (Kinemática, Suíça);
- Sistema para pré-concentração SPE, com capacidade de preparação de 20 amostras simultâneas (Varian, EUA);
- Bomba de vácuo tipo D3 (Leybold-Heraeus, Alemanha);

3.3. Gases Utilizados

- Gás de arraste: Hélio 99,999% de pureza (White Martins e Air Products, Brasil);
- Gás *make up* do detector: Nitrogênio 99,999% de pureza (Air Products, Brasil);
- Gás para *autosampler*: Nitrogênio 99,99% de pureza (Air Products, Brasil);
- Gás usado para evaporação das amostras: Nitrogênio 99,99% de pureza (Air Products, Brasil).

3.4. Limpeza do material utilizado

A vidraria empregada na execução deste trabalho foi inicialmente enxaguada em água corrente e, em seguida, deixada em contato com solução 5% (v/v) de Extran[®] alcalino e neutro, por no mínimo, 6 e 12 h, respectivamente. Após este período os materiais foram lavados com água destilada/deionizada, seguido de lavagem com acetona p.a. e secos em estufa de circulação de ar à 100 °C, por no mínimo 30 min, exceto as vidrarias volumétricas (BUHR *et al.*, 2000). Os materiais limpos foram então armazenados em armário fechado, em recipientes fechados.

3.4.1. Silanização da vidraria

A vidraria empregada nas etapas de concentração do extrato foram silanizadas conforme procedimento indicado no manual do cromatógrafo a gás. O procedimento de silanização envolveu a lavagem do material com uma mistura de metanol/diclorometano/hexano 1:1:1 (v/v) em banho de ultra-som durante 30 a 60 min. Após ser seco em estufa a 100 °C, o material foi preenchido com uma solução de dimetildiclorosilano a 5% e submetido a banho de ultra-som por 10 min. Então, foi enxaguado por 2 vezes com hexano e metanol. A cada enxágüe, foi sonicado por 2 a 3 min. De acordo com o manual, a execução correta do procedimento garante a silanização da vidraria por um período de 2 meses (Varian, 1998).

3.5. Pesticidas selecionados

Os pesticidas selecionados para este estudo, juntamente com o padrão interno escolhido, encontram-se listados na Tabela 1, com os respectivos fornecedores e graus de pureza dos padrões de referência.

Tabela 6. Princípios ativos utilizados com os respectivos fornecedores e graus de pureza.

Pesticida	Fornecedores	Grau de pureza (%)
Azoxistrobina	Dr. Ehrenstorfer	99,5
Captana	Dr. Ehrenstorfer	99,5
Clorotalonil	Dr. Ehrenstorfer	98,0
Clorpirifós	Dr. Ehrenstorfer	98,5
Cresoxim metílico	Dr. Ehrenstorfer	99,5
Deltametrina	Dr. Ehrenstorfer	99,0
Fenpropatrina	Dr. Ehrenstorfer	98,5
Iprodiona	Dr. Ehrenstorfer	99,0
Lindano (PI)	AccuStandard	99,5
Procimidona	Dr. Ehrenstorfer	98,0

Maiores informações sobre estes princípios ativos encontram-se listadas no Apêndice A.

3.6. Preparo das soluções analíticas

De cada pesticida escolhido para a realização deste estudo, preparou-se 10 mL de solução estoque com concentração de 1000 mg L⁻¹ (solução 1), através da dissolução do padrão de referência em tolueno. Estas soluções foram armazenadas em frascos âmbar e estocadas a -18 °C. Para os padrões de referência com teor de pureza inferior a 99%, efetuou-se a correção das pesagens, conforme recomenda a literatura (GARP, 1999).

A partir das soluções estoques iniciais preparou-se uma solução intermediária de 100 mg L⁻¹ de deltametrina (solução analítica 2), para ser utilizada na preparação da mistura de todos os princípios ativos, já que este pesticida demonstrou relação resposta/concentração muito superior aos demais. A solução analítica 3 foi preparada de modo a conter a mistura dos pesticidas em estudo, em diferentes concentrações, a fim de se obter relação resposta/sinal semelhante entre os compostos além de satisfazer as diferentes concentrações necessárias ao estudo. Preparada através da diluição, em acetato de etila, de diferentes alíquotas da solução estoque de cada pesticida em estudo (soluções analíticas 1 e 2) em balão volumétrico de 10 mL, como demonstra a Tabela 7, a solução analítica 3 foi armazenada em frasco de vidro âmbar, a temperatura de -18 °C, e utilizada como solução mãe para a preparação das diluições posteriores, algumas utilizadas para a construção das curvas analíticas.

Tabela 7. Preparo da solução analítica 3, em acetato de etila, obtida a partir da soluções analíticas 1 (1000 mg L⁻¹) e 2 (100 mg L⁻¹).

Princípios ativo	Concentração da solução estoque (mg L ⁻¹)	Volume utilizado (µL)	Concentração final (mg L ⁻¹)
Azoxistrobina	1000	250	25,0
Captana	1000	100	10,0
Clorotalonil	1000	100	10,0
Clorpirifós	1000	100	10,0
Cresoxim metílico	1000	100	10,0
Deltametrina	100	100	1,0
Fenpropatrina	1000	100	10,0
Iprodiona	1000	250	25,0
Procimidona	1000	100	10,0

Assim, para as curvas analíticas foi preparada a solução analítica 4, através da diluição de dez vezes a solução analítica 3, em acetato de etila. A Tabela 8 apresenta as diluições das soluções mãe para a obtenção das curvas analíticas, em acetato de etila e no extrato das matrizes analisadas, contendo $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ do padrão interno selecionado enquanto que a Tabela 9 apresenta as concentrações dos pesticidas em cada diluição confeccionada.

Devido ao fato da resposta dos analitos serem diferenciadas quando se encontram presentes nos extratos das matrizes e a fim de prevenir possíveis erros na quantificação e identificação devido ao efeito proporcionado por estas, utilizaram-se extratos “brancos” das matrizes selecionadas para preparação das soluções analíticas, sendo a faixa de concentração utilizada para a obtenção das curvas compreendida entre $0,025$ e $2,5 \text{ mg L}^{-1}$, para os pesticidas azoxistrobina e iprodiona, de $0,001$ e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, para deltametrina, e de $0,01$ e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ para os demais pesticidas. Amostras “branco” de cada matriz foram extraídas separadamente, purificadas e concentradas por evaporação a secura, sob fluxo de nitrogênio conforme o procedimento otimizado, sendo os extratos resultantes reconstituídos com solução $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ do PI e recolhidos num mesmo recipiente. O extrato reconstituído foi dessa forma utilizado como meio para a preparação das diluições das soluções analíticas das curvas contruídas em cada tipo de matriz.

Tabela 8. Preparo das soluções analíticas, em acetato de etila e no extrato das matrizes utilizadas, obtidas a partir das soluções analíticas intermediárias 3 e 4.

Solução de partida	Nº da solução preparada	Solvente		Extrato da matriz	
		Vol. solução de partida (μL)	Vol. final (mL)	Vol. solução de partida (μL)	Vol. final (mL)
3	5	10	10	10	1,0
	6	10	5	20	1,0
	7	100	10	100	1,0
4	8	100	5	20	1,0
	9	300	10	30	1,0
	10	400	10	40	1,0
	11	250	5	50	1,0
	12	400	5	80	1,0
	13	1000	10	100	1,0

Tabela 9. Concentrações (mg L^{-1}) das soluções analíticas contendo os princípios ativos em estudo, em solvente e nas matrizes, e suas respectivas numerações.

Princípios ativos	Nº das soluções analíticas								
	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Azoxistrobina	0,025	0,05	0,25	0,5	0,75	1,0	1,25	2,0	2,5
Captana	0,01	0,02	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,8	1,0
Clorotalonil	0,01	0,02	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,8	1,0
Clorpirifós	0,01	0,02	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,8	1,0
Cresoxim metílico	0,01	0,02	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,8	1,0
Deltametrina	0,001	0,002	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,08	0,1
Fenpropatrina	0,01	0,02	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,8	1,0
Iprodiona	0,025	0,05	0,25	0,5	0,75	1,0	1,25	2,0	2,5
Procimidona	0,01	0,02	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,8	1,0

3.7. Seleção do Padrão Interno

Foram preparados 10 mL de solução estoque dos princípios ativos paration metílico, em tolueno, aldrin e lindano, em n-hexano, heptacloro e hexaclorobenzeno, em acetato de etila, separadamente, em concentração de 1000 mg L^{-1} . Posteriormente, estes princípios ativos, em concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, foram testados como padrão interno (PI). Para este teste, 10 μL de cada solução foi adicionada separadamente a 1 mL de solução analítica 4 contida em *vial*, imediatamente antes das injeções no cromatógrafo a gás. O melhor PI foi selecionado de acordo com sua sensibilidade, resolução e tempo de retenção. Assim, a partir do princípio ativo selecionado foi preparada uma solução analítica $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ em acetato de etila que foi empregada para as diluições das soluções utilizadas na construção das curvas analíticas e na reconstituição do extrato evaporado. Da mesma forma que as demais, estas soluções foram estocadas em freezer à $-18 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.8. Otimização das condições cromatográficas

Em procedimentos analíticos onde se empregam técnicas cromatográficas, tal como a cromatografia gasosa, devem-se seguir alguns parâmetros importantes a fim de se obter maior eficiência, sensibilidade e seletividade na separação dos compostos.

3.8.1. Coluna cromatográfica e programação de temperatura

Para a separação dos pesticidas em estudo foi empregada coluna capilar DB-5, a qual foi submetida a várias rampas de aquecimento do forno da coluna (Tabela 10). Para estes testes foi utilizada a solução analítica 7, cujas concentrações dos princípios ativos estão demonstradas na Tabela 9.

Tabela 10. Programas de temperatura do forno da coluna, utilizados na otimização da separação cromatográfica.

Método	Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C min ⁻¹)	Manutenção da temperatura (min)	Tempo de análise (min)
M1	Inicial	90	-	1	1,0
	1	300	20	3	14,5
M2	Inicial	80	-	1	1,0
	1	200	10	0	13,0
	2	300	10	3	26,0
M3	Inicial	90	-	1	1,0
	1	200	10	0	12,0
	2	232	2	0	28,0
	3	300	4,5	3	46,1
	4	330	15	0	48,1
M4	Inicial	60	-	1	1,0
	1	200	10	0	15,0
	2	232	2	0	31,0
	3	300	15	0	35,5
M5	Inicial	80	-	1	1,0
	1	200	2	0	13,0
	2	220	15	0	14,3
	3	300	4,25	0	23,9
M6	Inicial	80	-	2	2,0
	1	180	15	1	9,7
	2	220	7	0	15,4
	3	300	15	3	23,7

M7	Inicial	80	-	2	2,0
	1	180	15	1	9,7
	2	220	10	0	13,7
	3	300	15	3	22,0
M8	Inicial	80	-	2	2,0
	1	185	20	1	8,2
	2	255	5	0	22,2
	3	300	20	2	26,5
M9 ^(a)	Inicial	150	-	2	2,0
	1	170	8	4	8,5
	2	255	8	0	19,3
	3	300	15	3,9	26,0
M10	Inicial	80	-	2	2,0
	1	185	15	1	10,0
	2	255	8	0	18,7
	2	315	15	4,25	27,0

(a)= Columé *et al.* (2001)

3.8.2. Estudo da vazão ótima do gás de arraste

Para selecionar a melhor vazão a ser empregada na separação cromatográfica dos compostos em estudo, injetou-se 1 μL da solução analítica 7 sem a presença do PI, descrita na Tabela 9. Testaram-se diferentes vazões: 1,6 , 1,7 , 2,1 , 2,4 , 2,6 e 3,1 mL min^{-1} . A vazão ótima foi determinada através da construção da curva de van Deemter, conforme descrito no item 2.8.4, para os pesticidas em estudo. De acordo com o fabricante da coluna, a vazão ótima para o gás de arraste deve ser $\leq 5 \text{ mL min}^{-1}$.

3.8.3. Vazão do gás complementar (make up) do detector

O gás nitrogênio foi usado como *make up* do detector, sendo sua vazão mantida constante em 30 mL min^{-1} , conforme recomendações do fabricante do cromatógrafo a gás.

3.8.4. Sistema de injeção

Para otimizar as condições do sistema de injeção, foram testados insertores de vidro silanizado de 0,5 e 2 mm de diâmetro interno, na temperatura de 270 °C. Testou-se também o volume de injeção, de 1 e 2 µL, usando-se a solução analítica 7, descrita na Tabela 9, juntamente com PI na concentração de 30 µg L⁻¹.

O modo de injeção, efetuado com o auxílio de amostrador automático, consistiu na aspiração de 0,5 µL de solvente isoctano/acetona 9:1 (v/v), 0,5 µL de ar, 1,0 µL de extrato e/ou acetato de etila, com a mistura dos pesticidas e 0,5 µL de ar novamente.

3.9. Avaliação da separação cromatográfica

Os parâmetros empregados para avaliar a separação cromatográfica dos compostos em estudo foram: fator de retenção (*k*), resolução (*R_s*) e fator de separação (*α*). Estes parâmetros foram calculados utilizando-se as equações definidas nos itens 2.8.1, 2.8.2 e 2.8.3, a partir dos cromatogramas obtidos pela injeção da solução analítica 7, contendo 0,03 mg L⁻¹ do PI. Para determinar o tempo de saída do analito não retido (*t_M*) foram analisados vapores de diclorometano na forma de *headspace*.

Cada composto foi identificado individualmente, analisando-se a solução analítica contendo apenas um princípio ativo, na concentração de 1,0 mg L⁻¹. Posteriormente, analisou-se uma solução analítica contendo todos os princípios ativos. Para confirmação, adicionou-se cada princípio ativo individualmente na solução analítica contendo a mistura, injetou-se e observou-se o aumento do sinal do respectivo composto. Em seguida, foi preparada uma solução contendo a mistura dos princípios ativos de modo que possuíssem resposta, em termos de sinal, semelhantes. Todas as injeções foram realizadas sob as mesmas condições cromatográficas, observando-se e confirmando-se o tempo de retenção de cada composto.

3.10. Preparação e armazenamento de amostras

Neste estudo foram avaliadas amostras de maçã nacionais, do tipo *gala* e uma variedade importada e uvas de mesa, das variedades *rubi* e *itália*. Porém, não foi possível determinar com exatidão as variedades referentes à cultura do morango devido à diversidade destes, encontrada muitas vezes no mesmo lote de amostra.

As amostras adquiridas no comércio local estão listadas nas Tabelas 11, 12 e 13, juntamente com seus dados relevantes.

Tabela 11. Código, locais de aquisição e origem das amostras de morangos avaliadas.

Códigos das amostras	Locais de venda	Locais de origem
A1	Mercado 1	Santa Maria
A2	Fruteira	Farroupilha/Feliz
A3	Feira livre de Santa Maria	Escadinhas/Feliz
A4	Feira livre de Santa Maria	Feliz
A5	Feira livre de Santa Maria	Itaara
A6	Mercado 2	Caxias do Sul
A7	Feira de produtos agroecológicos	Santa Maria
A8	Feira livre de Santa Maria	Caxias do Sul
A9	Feira livre de Santa Maria	Agudo
A10	Mercado 3	Santa Maria
A11	Feira livre de Santa Maria	Santa Maria
A12	Feira livre de Santa Maria	Caxias do Sul

Tabela 12. Código, locais de aquisição e origem das amostras de maçã.

Códigos das amostras	Locais de venda	Locais de origem
M1	Mercado 1	Vacaria
M2	Mercado 3	Santa Maria
M3 ^(a)	Mercado 2	Vacaria
M4	Fruteira	Vacaria
M5 ^(a)	Mercado 3	Fraiburgo - SC
M6	Mercado 3	Importada -Argentina

(a)=Produto vendido em embalagem diferenciada, direcionado ao público infantil.

Tabela 13. Código, locais de aquisição, origem e variedade das amostras de uva avaliadas.

Códigos das amostras	Locais de venda	Locais de origem	Variedade
G1	Mercado 1	CEASA -SP	<i>itália</i>
G2	Feira livre de Santa Maria	Paraná	<i>rubi</i>
G3	Feira livre de Santa Maria	Caxias do Sul	<i>itália</i>
G4	Mercado 3	CEASA - SP	<i>rubi</i>
G5	Mercado 2	CEASA - SP	<i>rubi</i>
G6	Fruteira	CEASA - SP	<i>rubi</i>

As amostragens das frutas estudadas foram realizadas de acordo com as recomendações da Legislação Federal de Agrotóxicos e Afins (BRASIL, 1998) e *Codex Alimentarius* (CLIFTON & MELOAN, 1996). Foram adquiridos 1,0 kg de frutos para morangos e uvas e 2,0 kg para maçãs e, segundo indicado por procedimentos oficiais (BRASIL, 1998 e CLIFTON & MELOAN, 1996), foram descartadas as hastes. As amostras foram lavadas, fracionadas e homogeneizadas em liquidificador industrial, sendo armazenadas em frascos de vidro silanizado, a -18 °C, até o momento da análise.

3.11. Teste em branco da extração com solventes

Com o intuito de avaliar a presença de interferências relativas aos solventes utilizados na extração realizou-se um teste em branco, ou seja, desenvolveu-se todo o processo de extração, purificação e concentração otimizado apenas com a mistura de solventes de extração, sem a presença dos analitos, porém com a presença do PI contido no solvente utilizado para reconstituição e levou-se a solução obtida a análise cromatográfica.

3.12. Avaliação de amostras para uso como amostra branco

Na ausência de material de referência e/ou de amostras isentas de resíduos de pesticidas, todas as amostras de morango, maçã e uva adquiridas foram avaliadas

para uso como *amostra branco*¹ no processo de validação do procedimento. Essas amostras foram submetidas aos procedimentos de extração e purificação otimizados.

3.13. Avaliação da adsorção dos pesticidas

Para avaliar a adsorção dos princípios ativos nas etapas de *purificação* e concentração por evaporação de solvente, foi realizada adição de padrão em extrato de amostra *branco* de morango (A11), de modo que resultasse numa solução de concentração no nível F2. Esta foi submetida às etapas em questão, utilizando material silanizado e não silanizado.

3.14. Estudo do procedimento de extração

Neste estudo, foram avaliados diferentes procedimentos de extração citados na literatura, os quais serão nomeados como P1, P2, P3, P4, P5 e P6 e descritos sucintamente ao longo do texto.

O procedimento P1, adaptado do MRM1 (GENERAL INSPECTORATE FOR HEALTH PROTECTION, 1996), também empregado por KURZ (2002) consiste na extração de 25 g de amostra utilizando acetato de etila (70 mL) em presença de sulfato de sódio anidro (25,0 g).

P2, aplicação do método de Luke (LUKE *et al.*, 1975), consistiu na extração de uma alíquota de 15 g de amostra, em ultra-turrax, por 1 min a velocidade máxima, com três alíquotas de 30 mL de solventes de diferentes polaridades (acetona, éter de petróleo e diclorometano, respectivamente) seguida por centrifugação, evaporação e diluição do extrato obtido em cinco vezes com acetato de etila.

P3 e P4 foram realizados com solventes de média polaridade, ou seja, acetona (STAJNBAHER & ZUPANCIC-KARALJ, 2003) e metanol (TOPUZ *et al.*, 2004), respectivamente.

P3, numa adaptação de STAJNBAHER & ZUPANCIC-KARALJ (2003), consistiu na extração de 10 g de amostra com 20 mL de acetona em ultra turrax, a

¹ Entenda-se por *amostra branco* a amostra sem presença de resíduos de pesticidas

velocidade máxima por 2 min, seguida de centrifugação do extrato a 3000 rpm por 5 min. O sobrenadante obtido foi diluído a 140 mL com água purificada e metade foi purificado/pré-concentrado em cartuchos de C18 e a outra metade em SDB-L. A eluição dos compostos de interesse se deu com, primeiramente, 2 mL de acetato de etila contendo 2% de trietilamina, seguidos de 3 alíquotas de 2 mL da mistura acetato de etila/acetona 9:1 (v/v). O eluato recolhido foi concentrado a 350 µL e analisado no sistema cromatográfico.

P4, numa adaptação do procedimento sugerido por TOPUZ *et al.* (2004) fez-se uso de 15 mL de metanol para a extração de 25 g de amostra, sob agitação, seguida de diluição do extrato obtido em 50 mL da água destilada/denionizada. Percolou-se o extrato obtido em cartucho de C18, elui-se com de 3 mL de diclorometano, concentrou-se o extrato em 15 vezes por evaporação, levando-se para posterior análise cromatográfica. Utilizou-se, também, o procedimento análogo descrito por TOPUZ *et al.* (2004) para testes com cartucho de fase polimérica, SDB-L.

Em P5 e P6 foram realizados testes com combinações de solventes de média e baixa polaridade, a fim de se obter a máxima recuperação possível. Dentre estas, foram realizadas extrações de 25 g de amostra com alíquotas de 70 mL de misturas de solventes tais como as proporções 1:1 (v/v) de acetona e hexano (teste P5) e 7:3, 1:1 e 3:7 (v/v) da combinação de acetato de etila e hexano (testes compreendidos em P6).

Partindo-se da extração com melhores resultados para os nove pesticidas em estudo, foram avaliadas a quantidade de amostra utilizada, o volume de solvente empregado e a necessidade de concentração dos analitos e purificação do extrato da matriz.

3.14.1. Estudo do procedimento de purificação dos extratos

A etapa de purificação foi adicionada ao procedimento de análise em função da concentração do extrato da matriz, o que implicou na concentração de interferentes provenientes desta. Para esta etapa do estudo foram utilizadas colunas de vidro borossilicato com diâmetro interno de 1,0 cm, preenchidas com florisil[®] (parte inferior) e sulfato de sódio anidro (parte superior), e submetidas a um sistema com pressão reduzida, conforme Figura 2.



Figura 2. *Manifold* para SPE usado para purificação dos extratos.

Para os estudos de *clean up* dos extratos de frutas foram avaliadas diferentes quantidades de florisil[®] ativado (1,3; 1,5; 1,7; 2,0 e 2,5 g) para cada mini-coluna, com quantidade fixa de 3,5 g de sulfato de sódio anidro. A necessidade de condicionamento do florisil[®] com solvente também foi avaliada.

Acetato de etila e hexano foram testados como eluente em proporção 1:1 (v/v) e individualmente. Variou-se também o volume de eluente (2, 3 e 4 mL) sendo que o volume final, após *clean up*, foi aferido em balão volumétrico (10 mL).

3.15. Validação do procedimento analítico

Definidas as melhores condições cromatográficas para a separação dos pesticidas e método de extração, purificação e concentração destes, validou-se o procedimento proposto.

3.15.1. Curva analítica

Os pesticidas em estudo foram quantificados utilizando-se o método da padronização interna. As curvas analíticas foram obtidas preparando-se misturas das soluções dos princípios ativos, em acetato de etila e em extratos concentrados das matrizes analisadas, ambos contendo 0,03 mg L⁻¹ do PI. Injetou-se no sistema

GC-ECD, três vezes ($n=3$), 1 μL das soluções analíticas 5 a 13 (Tabela 9), obtendo-se as áreas e o tempo de retenção de cada um dos compostos de interesse com o auxílio do *software* Star[®] 4.5 (Varian). As curvas analíticas foram obtidas, com auxílio do programa *Microsoft Excel* versão 7.0, plotando-se os valores de concentração dos princípios ativos no eixo das abscissas e a média dos valores obtidos pela divisão das áreas dos analitos pela área do PI, no eixo das ordenadas. Através deste *software* obtiveram-se os valores referentes ao coeficiente de determinação (r^2), coeficiente linear (b) e o coeficiente angular (a) das curvas analíticas.

3.15.2. Linearidade

Através dos dados obtidos para a construção da curva analítica, na faixa de concentração apresentada na Tabela 9, conforme descrito no APÊNDICE B, verificou-se a linearidade do método, conforme descrito no item 2.9.1

3.15.3. Limite de detecção e limite de quantificação

Para determinar o LOD e o LOQ empregaram-se soluções analíticas em acetato de etila e extratos das amostras concentrados e fortificados.

Na determinação do LOD do instrumento foram feitas injeções em ordem crescente de concentração partindo-se de uma solução diluída em acetato de etila (na concentração de $1,6 \mu\text{g kg}^{-1}$) até chegar a uma dada concentração onde as alturas dos picos foram três vezes superior em relação ao ruído da linha base nas proximidades do tempo de retenção dos picos de interesse. Já para o LOQ, injetou-se até atingir a concentração cuja altura dos picos foi dez vezes superior em relação ao ruído da linha base nas proximidades dos tempos de retenção dos picos de interesse.

Já na determinação do LOD e do LOQ do procedimento, extratos de amostras branco foram fortificados com os pesticidas em estudo nas concentrações de $1,6$ a $16,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ foram analisadas no sistema cromatográfico, obtendo-se as relações sinal-ruído conforme descrito para os limites instrumentais.

3.15.4. Procedimento de fortificação das amostras

No procedimento de fortificação é importante ter-se o máximo de garantia da incorporação dos analitos investigados à matriz que se analisa. Esse cuidado possibilita o desenvolvimento de condições de extração necessárias às amostras reais. Sendo assim, o tempo de contato entre a matriz e os analitos é um fator relevante (ORTELLI *et al.*, 2004). Assim, as amostras fortificadas foram agitadas manualmente e deixadas então em repouso por no mínimo 1 h antes do procedimento de extração.

3.15.5. Recuperação

A avaliação da porcentagem de recuperação foi realizada através da fortificação de amostras *branco* de morango, maçã e uva com pequenos volumes das soluções analíticas 3 (50 e 250 µL) e 4 (250 µL), nos níveis apresentados na Tabela 14, respectivamente, em triplicata. As amostras fortificadas foram submetidas ao procedimento de extração, purificação e concentração otimizado, sendo então analisadas no sistema cromatográfico.

Tabela 14. Concentrações dos princípios ativos em estudo nas matrizes (mg kg^{-1}) e nos extratos finais (mg L^{-1}) a partir dos três níveis de fortificação utilizados.

Princípio ativo	Nível de fortificação (mg kg^{-1})			Concentração no extrato final (mg L^{-1})		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3
Azoxistrobina	0,031	0,156	1,562	0,05	0,25	2,5
Captana	0,012	0,062	0,625	0,02	0,1	1,0
Clorotalonil	0,012	0,062	0,625	0,02	0,1	1,0
Clorpirifós	0,012	0,062	0,625	0,02	0,1	1,0
Cresoxim metílico	0,012	0,062	0,625	0,02	0,1	1,0
Deltametrina	0,001	0,006	0,062	0,002	0,01	0,1
Fenpropatrina	0,012	0,062	0,625	0,02	0,1	1,0
Iprodiona	0,031	0,156	1,562	0,05	0,25	2,5
Procimidona	0,012	0,062	0,625	0,02	0,1	1,0

3.15.6. Repetitividade

A repetitividade da resposta do instrumento (RSD_{ri}) foi avaliada efetuando-se três injeções para cada uma das soluções analíticas 6, 7, 11 e 13 no sistema cromatográfico.

A repetitividade do procedimento (RSD_{rp}) foi avaliada efetuando-se a etapa de extração e análise das amostras fortificadas nos três níveis avaliados nos testes de recuperação para as três matrizes avaliadas. Cada nível de concentração foi extraído em triplicata e cada extrato analisado três vezes.

3.15.7. Precisão intermediária

O estudo da precisão intermediária da resposta do instrumento (RSD_{pji}) foi realizado injetando-se três vezes no sistema cromatográfico as soluções analíticas nº 6, 7, 11 e 13 (Tabela 9), em dias diferentes, com intervalo de uma semana entre as análises.

Para o estudo da precisão intermediária do procedimento (RSD_{pip}) efetuou-se o método de extração e análise das amostras fortificadas nos mesmos três níveis avaliados no teste de recuperação. Cada nível de concentração foi extraído em triplicata e cada extrato analisado três vezes, em dois dias diferentes e com analistas diferentes.

3.16. Aplicação do procedimento desenvolvido

Para avaliar a aplicabilidade do procedimento desenvolvido, envolvendo extração, *purificação*, concentração e quantificação dos resíduos dos pesticidas estudados em frutas, foram utilizadas as amostras listadas nas Tabelas 6, 7 e 8, exceto as amostras A11, M2 e G6, as quais foram utilizados como amostras “branco”.

3.16.1. Confirmação por GC-MS

A presença dos pesticidas investigados neste estudo foi averiguada em amostras adquiridas no comércio local e a confirmação destes resíduos foi efetuada através de análises por GC-MS.

Através do cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massa é possível realizar uma varredura na amostra, ou seja, no modo *full scan* o equipamento realiza uma investigação de todos os íons gerados nas fragmentações das moléculas eluídas da coluna, exibindo-os ao operador sob forma de um espectro de massas. Porém, neste modo de operação a sensibilidade é prejudicada, sendo necessárias concentrações na ordem de mg L^{-1} para a detecção das substâncias. Desse modo, foi necessária a utilização do modo SIS onde são selecionados íons específicos para serem monitorados, nos respectivos tempos de retenção obtidos no modo *scan*, possibilitando a identificação dos compostos de interesse presentes no extrato da amostra em análise em níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$. A Tabela 15 exibe os compostos estudados com os dados utilizados para sua identificação por GC-MS.

A programação de temperatura para o forno da coluna utilizada no GC-MS foi de 80 °C com rampa de 25 °C min^{-1} até 180 °C, seguida por aquecimento de 5 °C min^{-1} até 280 °C, permanecendo por 10 min nesta temperatura, com tempo total de análise de 36 min. A temperatura inicial do injetor SPI (do *inglês Septum-equipped Programmable Injector*) foi de 80 °C, mantida por 0,1 min, seguida por rampa de 180 °C min^{-1} até 280 °C onde é a temperatura mantida por 27 min, a temperatura estabelecida para o *manifold* foi de 80 °C, temperatura de interface (*transferline*) em 230 °C e temperatura do íon *trap* em 200 °C. Empregou-se pressão constante do gás de arraste (He 6.0) em 20 psi e modo de injeção *splitless*; energia de 600 eV aplicada à multiplicadora de íons.

Tabela 15. Princípios ativos em estudo com seus respectivos tempos de retenção (t_R) no GC-MS e fragmentos utilizados para a sua identificação nos extratos das amostras.

Princípios ativos	t_R (min)	Íons (m/z)*
Clorotalonil	9,8	266 , 168, 109
Clorpirifós	12,0	314 , 197, 97
Captana	13,8	79 , 149, 117
Procimidona	13,7	283 , 216, 96
Cresoxim metílico	15,5	116 , 282, 206
Iprodiona	19,5	187 , 314, 245
Fenpropatrina	20,1	265 , 181, 97
Deltametrina	29,7	253 , 181, 91
Azoxistobina	30,4	344 , 139

* íon principal destacado em negrito

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção do padrão interno

Os pesticidas paration metílico, aldrin, lindano, heptacloro e hexaclorobenzeno foram avaliados como PI. Aldrin e paration metílico eluíram em tempos de retenção muito próximos ao clorpirifós e clorotalonil, respectivamente, resultando numa baixa resolução. Já o heptacloro apresentou sobreposição de sinal com clorotalonil, enquanto que o hexaclorobenzeno, apesar de não possuir interferências com os analitos, não exibiu boa performance para as condições cromatográficas definidas para este estudo, apresentando cauda acentuada. O lindano, por sua vez, apresentou boa resolução, não interferindo em nenhum dos tempos de retenção dos pesticidas em estudo, sendo assim, escolhido como PI.

4.2. Otimização das condições cromatográficas para GC-ECD

O método selecionado para a programação de temperatura do forno da coluna foi o nº 10 (M10 – conforme Tabela 10) o qual proporcionou melhores resultados na separação e resolução dos compostos em estudo, totalizando em 25 min de separação cromatográfica.

A coluna capilar apolar DB-5 de sílica fundida, com 30 m de comprimento, 0,25 mm d.i. e 0,25 µm de espessura do filme proporcionou separação mais eficiente dos pesticidas em tempo relativamente rápido, não ocorrendo sobreposição de picos com a programação de temperatura utilizada, como demonstra a Figura 3.

A influência do diâmetro interno do insersor de vidro silanizado também foi testada, conforme descrito no item 3.8.4. Sinais mais simétricos e com maiores valores de área foram obtidos com o insersor de 2 mm de diâmetro interno.

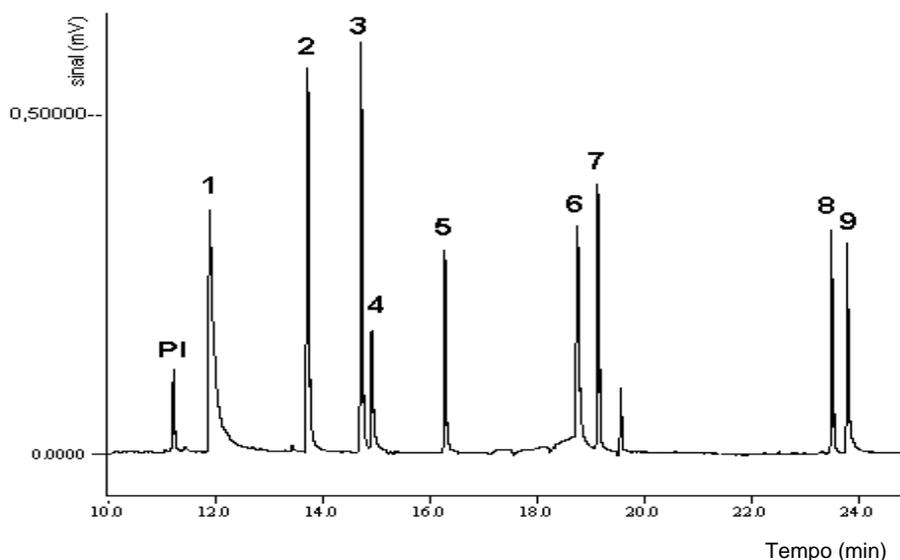


Figura 3. Cromatograma da solução analítica 9, em acetato de etila, contendo o PI selecionado (lindano) e os nove pesticidas em estudo (clorotalonil =1, clorpirifós =2, captana =3, procimidona =4, cresoxim metílico =5, iprodiona =6, fenpropatrina =7, deltametrina =8 e azoxistrobina =9)

4.2.1. Escolha da vazão ótima do gás de arraste

A vazão ótima do gás de arraste foi obtida através da construção da curva de van Deemter para cada composto em estudo, conforme itens 2.8.4 e 3.8.2, utilizando a programação de temperatura M10, sendo fixada em $1,7 \text{ mL min}^{-1}$, vazão que proporciona a menor altura equivalente aos pratos teóricos da coluna para a maioria dos pesticidas avaliados. Comparando-se os valores obtidos experimentalmente com a vazão ótima teórica calculada (μ) a partir da equação 6, demonstrada no item 2.8.4, que seria de $34,2 \text{ cm s}^{-1}$, verifica-se que os valores obtidos são semelhantes quando se considera a temperatura em que cada composto é eluído da coluna. No APÊNDICE B estão demonstradas as curvas de van Deemter para os pesticidas em estudo.

4.2.2. Condições cromatográficas adotadas para a separação dos pesticidas em estudo por GC-ECD

De modo geral, as melhores condições cromatográficas para a separação dos nove compostos em estudo e do PI escolhido foram as seguintes:

- Temperatura do injetor: 270 °C;
- Programação da válvula do *split* do injetor: *split* inicialmente aberto, razão 1:50; fechamento em 0,01 min; abertura após 0,8 min, razão 1:50; redução da razão para 1:20 após 2,0 min;
- Coluna capilar: apolar DB-5;
- Programação de temperatura do forno da coluna (M10) temperatura inicial de 80 °C, com rampa de 15 °C min⁻¹ até 185 °C, seguida de rampa de 8 °C min⁻¹ até 255 °C, e após acréscimos de 15 °C min⁻¹ até 315 °C, onde se manteve esta temperatura por 4,25 min, totalizando em 27 min de separação cromatográfica;
- Volume de injeção de 1,0 µL, com velocidade de injeção de 0,5 µL s⁻¹;
- Vazão da purga do septo: 3 mL min⁻¹;
- Pressão do gás de arraste na entrada da coluna: mantida em 21,0 psi, resultando numa vazão inicial de 1,7 mL min⁻¹ na coluna DB-5;
- Temperatura do detector: 330 °C.

4.3. Avaliação da separação cromatográfica

Os parâmetros t_R , k , R_s e α foram utilizados para avaliar a separação cromatográfica. A Tabela 16 apresenta os valores de t_R , k , R_s e α obtidos para a separação da mistura dos analitos em estudo e PI após análise cromatográfica da solução analítica 5, conforme o cromatograma demonstrado na Figura 3. O tempo de saída do analito não retido (t_M), como descrito no item 3.9 foi de 1,46 min.

Conforme os dados apresentados na Tabela 16, observa-se que os valores de k são bons para todos os compostos, estando dentro dos intervalos ideais para múltiplos componentes, sendo aceitáveis valores de k entre 0,5 e 20.

Para α obtiveram-se valores acima de 1 para todos os pares de compostos, o que é recomendado para separação entre dois picos adjacentes.

Os valores de R_s obtidos comprovam uma separação de 100% entre os pares de compostos, já que obtiveram-se valores de R_s superiores a 1,5, podendo assim serem quantificados com segurança.

Tabela 16. Parâmetros cromatográficos t_R , k , R_s e α obtidos para a separação da mistura dos compostos e PI, empregando a solução analítica 5.

Pesticidas	t_R (min)	k	R_s	α
Lindano	11,5	6,91	-	-
Clorotalonil	12,3	7,42	5,01	1,07
Clorpirifós	14,1	8,65	10,53	1,17
Captana	15,1	9,36	11,97	1,08
Procimidona	15,3	9,49	1,87	1,01
Cresoxim metílico	16,6	10,42	13,21	1,10
Iprodiona	19,1	12,12	20,81	1,16
Fenpropatrina	19,5	12,37	3,46	1,02
Deltametrina	23,5	15,15	43,12	1,22
Azoxistrobina	23,8	15,35	2,36	1,01

4.4. Teste em branco da extração com solventes

Na análise cromatográfica da solução obtida com o teste em branco dos solventes de extração, se constatou a presença de um interferente de intensidade significativa em aproximadamente 19,8 min que, porém, não interferiu nos tempos de retenção dos princípios ativos em estudo. Através de posterior análise por GC-MS, constatou-se que o sinal detectado era relativo ao composto metoxi-ciclopentano, um interferente presente em um dos solventes de extração, o n-hexano. O cromatograma do teste em branco, obtido por GC-ECD, está representado na Figura 4.

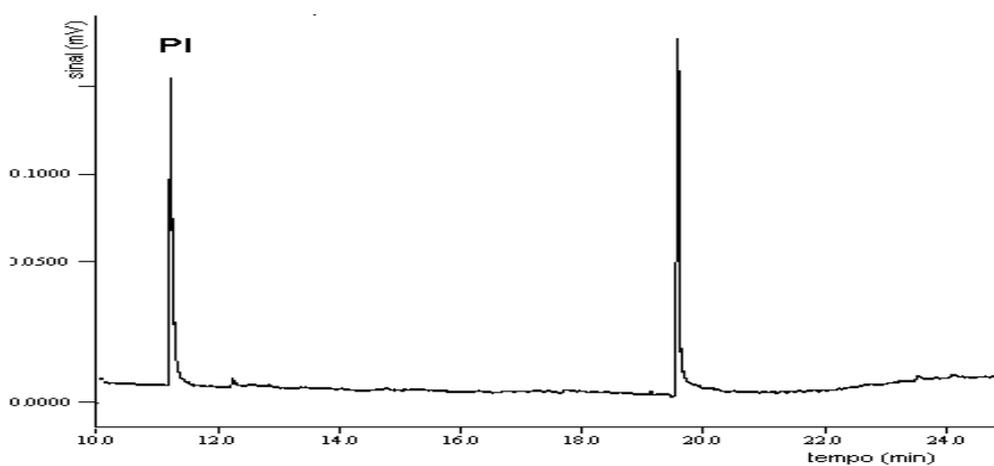
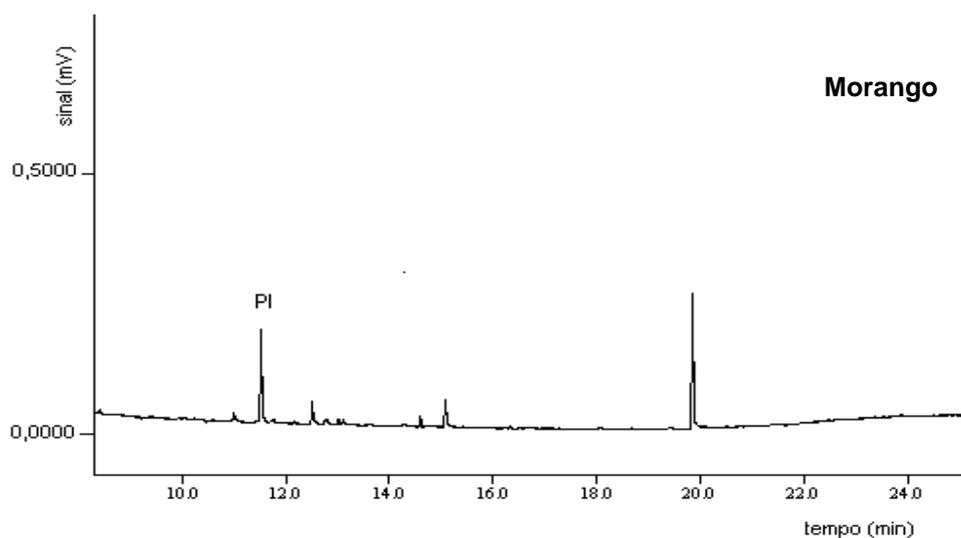


Figura 4. Cromatograma do teste em branco da extração com solvente.

4.5. Avaliação das amostras para uso como “branco”

Dentre as amostras analisadas e avaliadas para serem utilizadas como branco, foram selecionadas as amostras A11 para morango, G6 para uva e M2 para maçã como “amostras branco” sendo seus respectivos cromatogramas representados na Figura 5.



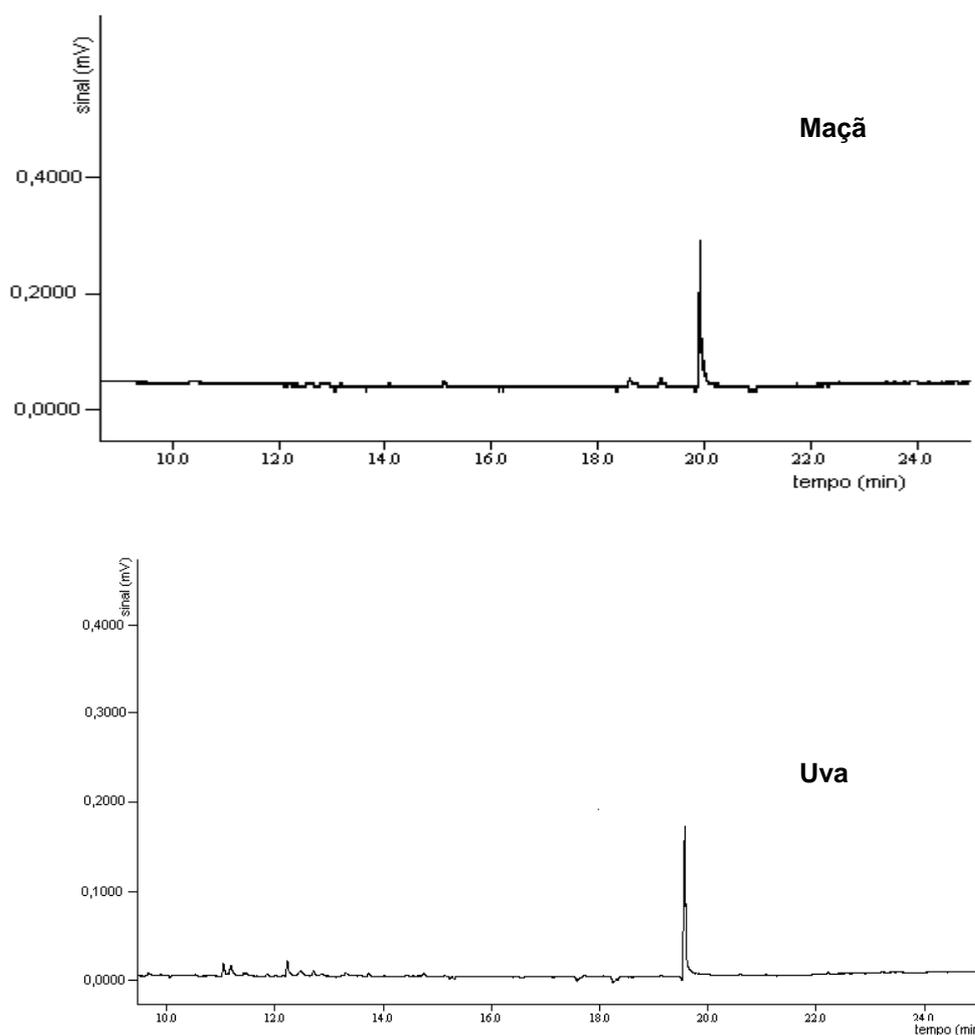


Figura 5. Cromatogramas de extratos de morango (A11), maçã (M2) e uva (G6) selecionados como “amostras branco” para estas matrizes.

4.6. Estudo da adsorção dos compostos

O procedimento de concentração realizado com vidraria silanizada demonstrou, após análise cromatográfica, melhor resultado de recuperação dos compostos de interesse comparados ao procedimento realizado sem a silanização da vidraria. Variações de 2 a 20 % em valores de área foram registradas para o nível de fortificação F2 para os pesticidas em estudo, sendo que estes valores aumentavam para todos os compostos quando se trabalhava em concentrações menores, tais como o primeiro nível de fortificação F1 (concentrações 5 vezes inferiores em relação a F2), proporcionando assim resultados de recuperações não satisfatórios, excedendo em todos os casos, no nível F1, os valores indicados pela literatura.

Assim, optou-se pela utilização de material silanizado para o procedimento de extração acima mencionado.

4.7. Avaliação da etapa de extração

Na realização de testes para verificar a eficiência de extração de diferentes métodos, utilizou-se a amostra A11 como amostra branco, sendo as análises realizadas em triplicata, fortificadas a concentração equivalente ao nível F2.

Os testes realizados com P1 apresentaram bons resultados de recuperação exceto para os pesticidas captana e procimidona, que não puderam ser quantificados, pois eluíram juntamente com impurezas provenientes da matriz.

Extrações com outros solventes de média polaridade, em P3 e P4, também foram averiguados, porém, como são solúveis em meio aquoso acabaram por extrair pigmentos hidrossolúveis da matriz, necessitando uma etapa de purificação eficiente. Nestes testes foram avaliadas colunas de florisil[®], que não se mostraram eficientes para este fim, e extração em fase sólida (SPE) com cartuchos de C18 e de material polimérico (SDB-L).

Nas extrações realizadas em P3, no procedimento proposto foram utilizados dois cartuchos distintos: C18 e SDB-L, sendo os extratos obtidos com SDB-L não injetados no sistema cromatográfico devido a grande quantidade de pigmentos nele ainda presentes nestes, ou seja, purificação ineficiente. Já os resultados obtidos com cartuchos de C18 produziram recuperações insatisfatórias, porém com uma boa purificação do extrato.

Em P4, utilizaram-se para a etapa de purificação dos extratos cartuchos de C18 segundo procedimento descrito por TOPUZ *et al.* (2004) e de SDB-L. Estes dois procedimentos de purificação não se mostraram totalmente eficientes, com interferências da matriz influenciando na recuperação de alguns compostos, como se pode ver na Tabela 17, porém com um cromatograma bem limpo, no caso do uso de C18.

Testes utilizando P2, com o método de Luke, demonstraram bons resultados, provavelmente devido à mistura de solventes empregados, obtendo-se assim extrações com recuperações satisfatórias. Este método apresentou recuperações relativamente boas, exceto para iprodiona (39,8%), fenpropatrina (61,4%) e

azoxistrobina (31,2%) e foi descartado devido à alta toxicidade dos solventes envolvidos na extração.

Tabela 17. Média das recuperações e respectivos RSD% obtidas em testes preliminares, realizados com amostra de morango branco (A11) fortificada ao nível F2.

Princípio ativo	P1		P2		P3 - C18		P4 - C18		P4 - SDB-L	
	R%	RSD %	R%	RSD %	R%	RSD %	R%	RSD %	R%	RSD %
Azoxistrobina	110,0	5,1	31,2	6,6	129,5	4,3	57,9	3,5	196,3	1,1
Captana	(a)	(a)	86,8	7,1	16,4	8,2	117,5	1,7	82,1	7,0
Clorotalonil	119,2	5,9	92,0	5,1	35,9	3,3	163,7	2,0	108,9	2,2
Clorpirifós	78,2	7,6	105,7	2,5	66,9	3,1	54,8	1,7	61,9	1,8
Cresoxim metílico	85,1	14,1	116,1	4,6	83,4	7,4	107,7	1,4	77,7	2,2
Deltametrina	75,0	9,7	91,3	5,5	70,2	10,4	172,6	3,7	124,4	4,7
Fenpropatrina	78,0	6,0	61,4	1,1	70,3	12,1	127,4	0,8	93,9	0,9
Iprodiona	69,4	1,0	39,8	2,3	33,4	11,0	49,2	0,7	41,1	1,0
Procimidona	(a)	(a)	114,0	0,9	61,7	4,3	84,3	1,1	66,6	6,0

(a) = não foi possível determinar devido a interferências

Então, de acordo com o observado com o procedimento P2, combinaram-se solventes de média e baixa polaridade, nas proporções 1:1 (v/v), em testes P5 e P6. Os testes demonstraram que, apesar da separação de fases, a análise na combinação analisada em P5, proporcionar um extrato relativamente limpo, interferentes provenientes da matriz ainda perduravam, provocando recuperações acima de 120 %, além da deficiência na recuperação de certos analitos (iprodiona, fenpropatrina e azoxistrobina), como demonstra a Tabela 17.

Extrações realizadas em P6 na proporção 1:1 (v/v) apresentaram bons resultados de recuperação, sendo assim esta combinação de solventes foi levada a testes nas proporções 7:3 e 3:7 (v/v). As recuperações obtidas com estas diferentes proporções não foram consideradas satisfatórias, como demonstra a Tabela 18, sendo estas misturas descartadas como opção de extração.

Tabela 18. Média dos percentuais de recuperação utilizando-se misturas de solventes descritos nos procedimentos P5 e P6, para amostra de morango branco (A11) fortificada ao nível F2.

Princípio ativo	P6						P5	
	3:7 (v/v)		1:1 (v/v)		7:3 (v/v)		1:1 (v/v)	
	R%	RSD%	R%	RSD%	R%	RSD%	R%	RSD%
Azoxistrobina	120,3	8,6	104,8	3,1	105,6	5,9	34,7	8,4
Captana	82,1	2,5	98,3	3,3	85,4	13,2	112,2	1,5
Clorotalonil	82,8	10,2	109,4	1,8	104,1	6,7	253,6	1,6
Clorpirifós	68,8	7,9	93,5	4,2	115,5	3,4	108,5	1,9
Cresoxim	88,3	2,8	100,5	1,4	81,2	9,8	167,3	4,1
Deltametrina	89,4	9,4	84,1	5,5	70,3	8,1	59,3	3,2
Fenpropatrina	70,8	4,9	102,9	2,7	81,3	1,5	145,5	3,4
Iprodiona	67,7	4,6	80,7	3,1	74,8	4,5	48,3	1,0
Procimidona	75,8	1,9	92,9	0,4	68,1	17,8	117,3	1,6

Após a escolha do melhor procedimento para extração, partiu-se para a otimização do processo, onde se testaram diferentes quantidades de amostra e solventes para os ensaios. Inicialmente, partiu-se de 25 g de amostra e 70 mL de solvente. A fim de reduzir volumes, diminuiu-se para 10,0 g a quantidade de amostra utilizada e testaram-se os volumes de 20, 25 e 30 mL para sua extração nos demais testes com solventes. Ainda com a possibilidade de redução de volumes, mas não a redução de representatividade, optou-se pela utilização de 4,0 g de amostra, redução de 2,5 vezes do procedimento otimizado anteriormente, onde também foram testados os volumes de 10 e 13 mL para sua extração.

Assim, como procedimento de extração otimizado optou-se pela utilização de alíquotas de 4,0 g de cada amostra, previamente descongeladas a temperatura ambiente, devidamente pesadas em tubos de teflon[®] com tampa e levadas a extração em turrax, a 15.000 rpm por 20 s, com 10 mL da mistura de solventes, acetato de etila/hexano na proporção 1:1 (v/v). Em seguida, estas foram levadas à centrifugação por 5 min a 4000 rpm, sendo o sobrenadante obtido coletado com pipetas de Pasteur e purificado em colunas de florisil[®].

Para a etapa de purificação foram ensaiadas diferentes quantidades de florisil[®], onde foi considerada como a massa ótima a quantidade de 1,5 g deste sorbente, aliado ao uso de 3,5 g de sulfato de sódio anidro para a secagem deste extrato, não havendo necessidade de condicionamento destes com solventes. Porém, detectou-se a necessidade de lavagem da coluna após a percolação do extrato e para isto foi adotado o volume de 3 mL da mistura de solventes acetato de etila/ hexano 1:1 (v/v) divididos em três alíquotas de 1 mL cada.

Então, para a conseqüente purificação utilizaram-se aproximadamente 10 mL de extrato (sobrenadante retirado da amostra extraída) para cada coluna, sendo este juntamente com o solvente de lavagem das colunas coletado em balões volumétricos de 10 mL e aferidos a 10 mL com a mistura de solventes acetato de etila/ hexano 1:1 (v/v).

No intuito de diminuir os limites de detecção e quantificação, os extratos das amostras estudadas neste trabalho foram submetidos a testes para sua concentração onde se utilizaram concentrações de duas, três, quatro, cinco e dez vezes. A concentração do extrato escolhida foi a de quatro vezes pois mostrou a maior taxa de concentração com menor interferência do extrato.

Desta forma, 4 mL do extrato foram levados à concentração em *vials* (previamente silanizados) através da evaporação do solvente sob fluxo de nitrogênio até sua secura. Após, realizou-se a reconstituição deste com 1 mL de acetato de etila, contendo 30 µg L⁻¹ do PI (lindano), e levou-se o extrato obtido para análise cromatográfica.

4.8. Validação do procedimento desenvolvido

Definidas as melhores condições de separação para os compostos estudados e o método de extração, purificação e concentração, o passo seguinte foi à validação do método proposto, sendo os resultados obtidos apresentados a seguir.

4.8.1. Curva analítica

A Tabelas 19, 20, 21 e 22 contêm os dados referentes às equações de reta, coeficientes angular e linear representados por a e b, respectivamente, obtidas na construção das curvas analíticas em acetato de etila e no extrato das matrizes para cada pesticida avaliado, além dos respectivos r^2 nestas obtidos.

Devido à ampla faixa de concentração trabalhada, uma única curva analítica não se mostrou linear em toda sua extensão para todos os compostos estudados. Assim, foi necessária a adoção de sua divisão, como demonstra a Tabela 19, em dois segmentos lineares, compreendendo os intervalos nomeados de A (de 0,025 a 0,75 para azoxistrobina e iprodiona, de 0,001 a 0,03 para deltametrina e de 0,01 a 0,3 mg L⁻¹ para os demais pesticidas) e de B (de 0,75 a 2,5 para azoxistrobina e iprodiona, de 0,03 a 0,1 para deltametrina e de 0,3 a 1, mg L⁻¹ para os demais pesticidas), ambas realizadas em solvente e no extrato “branco” concentrado de cada matriz analisada. As curvas obtidas para cada segmento linear em solvente e nas diferentes matrizes encontram-se demonstradas no APÊNDICE D.

Tabela 19. Parâmetros das curvas analíticas, para as faixas de concentração de A e B, relacionados aos princípios ativos em solvente.

Pesticida	Curva analítica A			Curva analítica B		
	a	b	r^2	a	b	r^2
Azoxistrobina	17,062	-0,011	0,9988	21,532	-1,465	0,9996
Captana	26,842	-0,174	0,9996	25,752	0,810	0,9998
Clorotalonil	42,878	-0,342	0,9993	49,570	-2,540	0,9990
Clorpirifós	23,938	0,015	0,9996	21,649	0,529	0,9986
Cresoxim metílico	10,016	0,042	0,9993	10,239	0,2526	0,9993
Deltametrina	16,620	-0,085	0,9970	16,852	-0,893	0,9990
Fenpropatrina	9,746	0,004	0,9996	9,415	0,128	0,9989
Iprodiona	35,439	0,187	0,9995	51,467	3,945	0,9980
Procimidona	10,449	0,027	0,9984	10,758	-0,121	0,9989

Tabela 20. Dados referentes às curvas analíticas para os pesticidas em estudo, nas faixas de concentração A e B, obtidas no extrato “branco” de morango

Pesticidas	Morango					
	A			B		
	a	b	r ²	a	b	r ²
Azoxistrobina	21,851	0,147	0,9996	7,757	4,419	0,9988
Captana	18,266	0,028	0,9992	7,886	5,269	0,9925
Clorotalonil	49,203	-0,279	0,9988	10,558	11,511	0,9989
Clorpirifós	26,101	0,066	0,9999	5,440	6,315	0,9931
Iprodiona	19,258	0,158	0,9998	9,181	3,246	0,9992
Cresoxim metílico	11,487	0,009	0,9990	8,543	1,151	0,9958
Deltametrina	9,098	0,152	0,9996	7,665	1,026	0,9979
Fenpropatrina	10,477	0,096	0,9998	9,232	0,387	0,9985
Procimidona	7,693	0,117	0,9987	7,205	0,225	1,000

Tabela 21. Dados referentes às curvas analíticas para os pesticidas em estudo, nas faixas de concentração A e B, obtidas no extrato “branco” de maçã

Pesticidas	Maçã					
	A			B		
	a	b	r ²	a	b	r ²
Azoxistrobina	8,576	0,084	0,9998	10,730	-0,706	0,9988
Captana	16,517	-0,007	0,9990	10,624	2,028	0,9966
Clorotalonil	25,988	0,023	0,9992	34,723	-2,673	0,9986
Clorpirifós	15,617	0,314	0,9985	11,340	1,657	0,9963
Iprodiona	10,526	0,144	0,9997	10,656	0,052	0,9986
Cresoxim metílico	7,775	0,129	0,9986	8,940	-0,406	0,9975
Deltametrina	6,745	0,041	0,9992	8,441	0,538	0,9990
Fenpropatrina	8,634	0,083	0,9993	8,901	0,043	0,9983
Procimidona	5,855	0,142	0,9993	7,037	-0,204	0,9997

Tabela 22. Dados referentes às curvas analíticas para os pesticidas em estudo, nas faixas de concentração A e B, obtidas no extrato “branco” de uva

Pesticidas	Uva					
	A			B		
	a	b	r ²	a	b	r ²
Azoxistrobina	14,473	0,145	0,9997	4,366	3,285	0,9918
Captana	17,367	0,195	0,9988	4,367	4,058	0,9971
Clorotalonil	47,563	0,210	0,9985	11,154	11,020	1,0000
Clorpirifós	20,896	0,396	0,9981	4,051	5,379	0,9932
Iprodiona	11,114	0,087	0,9998	4,529	2,114	0,9910
Cresoxim metílico	9,523	0,148	0,9939	6,612	1,045	0,9913
Deltametrina	7,992	0,082	0,9931	7,450	0,193	0,997
Fenpropatrina	9,326	0,094	0,9991	4,282	1,711	0,9951
Procimidona	7,582	0,117	0,9987	4,797	0,985	0,9961

Para compensar variações relativas a flutuações de resposta do ECD, observadas entre cada análise, optou-se pela adoção da calibração interna, utilizando-se como PI o pesticida lindano, em concentração previamente otimizada de 0,03 mg L⁻¹. Desta forma, como se pode ver nas equações obtidas para curvas analíticas demonstradas, o método mostrou-se linear e adequado para os pesticidas avaliados, com valores de r² superiores a 0,99, variando de 0,9970 a 0,9998 em acetato de etila, entre 0,9925 a 1,0 no extrato de morango, de 0,9963 a 0,9998 na matriz de maçã e de 0,9910 a 1,0 quando utilizado extratos de uva para a preparação das soluções analíticas, podendo assim serem considerados satisfatórios para a análise de resíduos de pesticidas (CLIFTON & MELOAN, 1996).

4.8.2. Linearidade

No presente trabalho, considerou-se como faixa linear os pontos cujos valores de (S/Q)_i estão no intervalo 1,0 ± 0,05, ou seja, pontos cujas razões sinal/concentração não diferem mais de 5% do coeficiente angular da reta (a). Os valores obtidos para as curvas analíticas apresentaram linearidade satisfatória para os pesticidas em estudo em toda a faixa de concentração trabalhada pois todas as

curvas obtiveram $r^2 > 0,99$ (RIBANI *et al.*, 2005), porém ocorreram desvios na ordem de 14 % observados nos pontos de concentração $0,025 \text{ mg L}^{-1}$ para azoxistrobina, de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ para captana, $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ para fenpropratrina e de $0,001$ e $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ para deltametrina. As tabelas contendo os dados referentes ao cálculo de linearidade para cada um dos compostos estão dispostas no APÊNDICE C.

4.8.3. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

A Tabela 23 apresenta os valores obtidos de LOD e LOQ instrumental e do procedimento. Para facilitar a comparação, encontram-se na Tabela 5, item 2.6, os LMRs estabelecidos pela ANVISA vigentes no Brasil, União Européia (UE) e *Codex Alimentarius*.

Tabela 23. Valores obtidos de LOD e LOQ instrumental (LOD_i e LOQ_i) e LOQ do procedimento (LOQ_p) para cada extrato de matriz analisado.

Pesticida	LOD_i (mg L^{-1})	LOQ_i (mg L^{-1})	LOQ_p (mg kg^{-1})		
			Morango	Maçã	Uva
Azoxistrobina	0,0060	0,0125	0,0156	0,0078	0,0156
Captana	0,0025	0,0050	0,0031	0,0016	0,0031
Clorotalonil	0,0075	0,0100	0,0063	0,0047	0,0047
Clorpirifós	0,0025	0,0050	0,0047	0,0016	0,0031
Cresoxim metílico	0,0050	0,0100	0,0047	0,0031	0,0031
Deltametrina	0,0002	0,0008	0,0006	0,0006	0,0006
Fenpropratrina	0,0050	0,0075	0,0031	0,0031	0,0031
Iprodiona	0,0187	0,0250	0,0078	0,0078	0,0078
Procimidona	0,0075	0,0100	0,0063	0,0047	0,0031

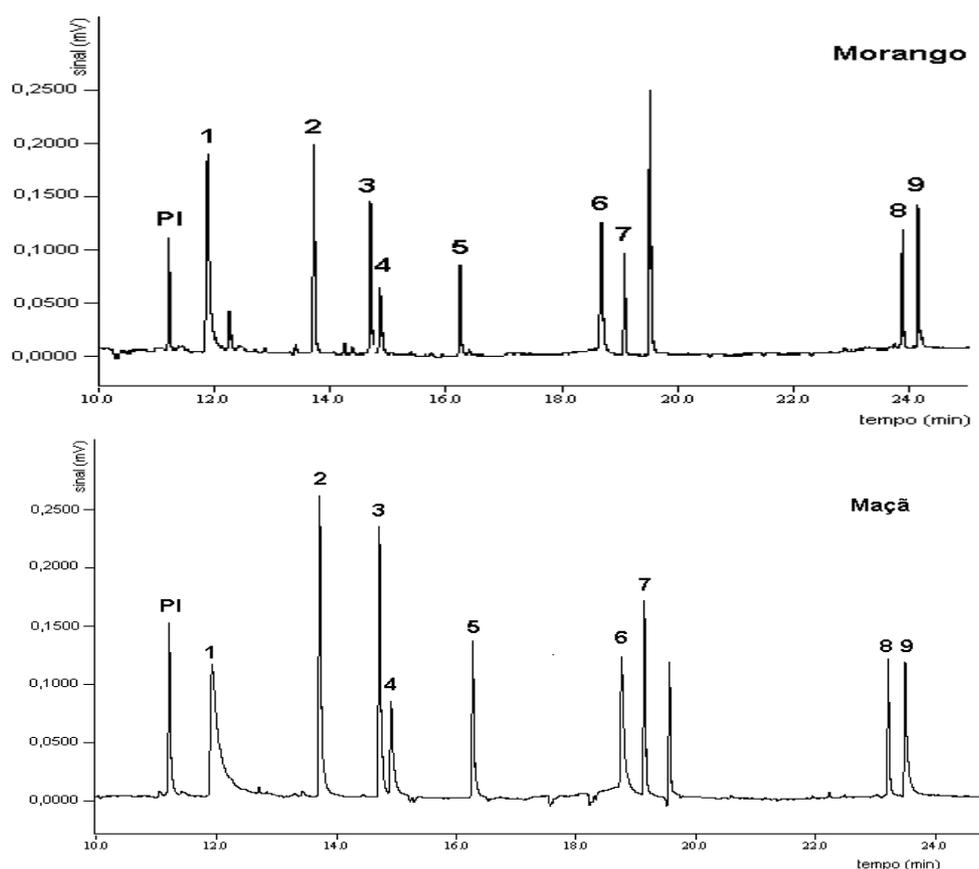
Os valores obtidos para LOD e LOQ podem ser considerados satisfatórios uma vez que tornam possíveis a identificação e quantificação dos pesticidas de interesse em concentrações, no mínimo, trinta vezes inferiores aos máximos permitidos pela Legislação Brasileira vigente, enquanto que variam de, no mínimo, 3,2 e 40 vezes inferiores aos limites permitidos pelo *Codex Alimentarius* e UE, respectivamente.

4.8.4. Recuperação

A Tabela 25 também apresenta os valores obtidos no teste de recuperação, com o respectivo RSD%, para fortificações em três diferentes níveis de concentração: 0,031, 0,156 e 1,562 mg kg⁻¹ para iprodiona e azoxistrobina, 0,001, 0,06 e 0,062 mg kg⁻¹ para deltametrina e 0,012; 0,062 e 0,625 mg kg⁻¹, para os demais pesticidas, concentrações estas que representam 2, 10 e 100 vezes o maior valor de LOQ do instrumento para a mistura dos princípios ativos (valor de LOQ_p obtido para o clorotalonil).

Os resultados de recuperação dos compostos, empregando a curva analítica preparada no extrato de cada matriz selecionada como amostra “branco”, e submetida aos mesmos processos, para o cálculo, são satisfatórios para todos os níveis de concentração, pois estão dentro dos valores aceitos, conforme descrito na literatura para métodos cromatográficos aplicados para determinação de pesticidas (GARP, 1999), os quais devem estar entre 70 e 120%, com valores de RSD menores que 15%.

Os cromatogramas de amostras fortificadas de morango, maçã e uva, no nível F2 estão representados nas Figura 6.



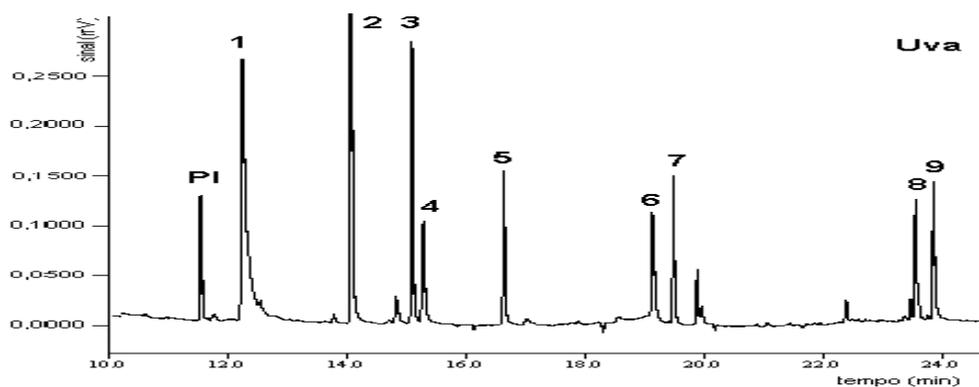


Figura 6. Cromatogramas de amostras “branco” de morango, maçã e uva, A11, M2 e G6 respectivamente, fortificadas ao nível de F2 contendo o padrão interno (lindano) e os pesticidas em estudo: clorotalonil (1), clorpirifós (2), captana (3), procimidona (4), cresoxim metílico (5), iprodiona (6), fenpropatrina (7), deltametrina (8) e azoxistrobina (9).

4.8.5. Repetitividade e precisão intermediária

A Tabela 24 apresenta a precisão em termos de repetitividade (RSD_{ri}) e precisão intermediária (RSD_{pii}) do instrumento para a resposta, em termos de área, das soluções analíticas 6, 7, 11 e 13, nos extratos das matrizes, cujas concentrações dos princípios ativos encontram-se na Tabela 9. O teste de precisão intermediária foi realizado com uma semana de intervalo, injetando-se três vezes cada solução padrão.

Tabela 24. Resultados médios de precisão em termos de repetitividade (RSD_{ri}) e precisão intermediária do instrumento (RSD_{pii}).

Pesticidas	Morango		Maçã		Uva	
	RSD_{ri} %	RSD_{pii} %	RSD_{ri} %	RSD_{pii} %	RSD_{ri} %	RSD_{pii} %
Azoxistrobina	4,9	6,5	3,4	5,3	3,4	7,0
Captana	4,7	7,3	1,9	2,1	1,9	2,1
Clorotalonil	3,3	4,1	5,1	6,0	2,9	6,1
Clorpirifós	3,0	3,6	1,9	3,8	5,1	7,1
Cresoxim metílico	1,9	6,2	3,8	5,9	3,8	5,9
Deltametrina	3,0	6,4	3,5	5,2	3,5	5,2
Fenpropatrina	4,6	10,0	3,0	4,8	3,0	4,8
Iprodiona	3,2	3,9	2,2	3,6	2,2	3,6
Procimidona	2,8	6,8	2,7	6,8	2,7	6,8

Resultados e Discussão

Os resultados em termos de repetitividade e precisão intermediária do instrumento, obtidos para as concentrações avaliadas nas soluções preparadas em extratos das matrizes são aceitáveis, uma vez que estão dentro do limite aceito pelo roteiro de validação de métodos cromatográficos aplicados a pesticidas (GARP, 1999), onde a precisão para valores de área deve ser $\leq 15\%$.

Já nos ensaios de repetitividade e precisão intermediária do procedimento, apresentados nas Tabela 25, observaram-se valores de RSD dentro dos limites considerados aceitáveis para este tipo de análise, variando de 0,3 a 5,6 % e de 0,5 a 10,8 %, respectivamente, para os ensaios com morango, de 0,6 a 5,2 % e de 0,4 a 14,8 %, respectivamente, para maçã e de 0,6 a 5,7% e de 0,2 a 12,3 %, respectivamente, nos ensaios com a matriz uva.

Tabela 25. Resultados de recuperação, precisão em termos de repetitividade (RSD_{rp}) e precisão intermediária (RSD_{pip}) do procedimento para as matrizes em estudo

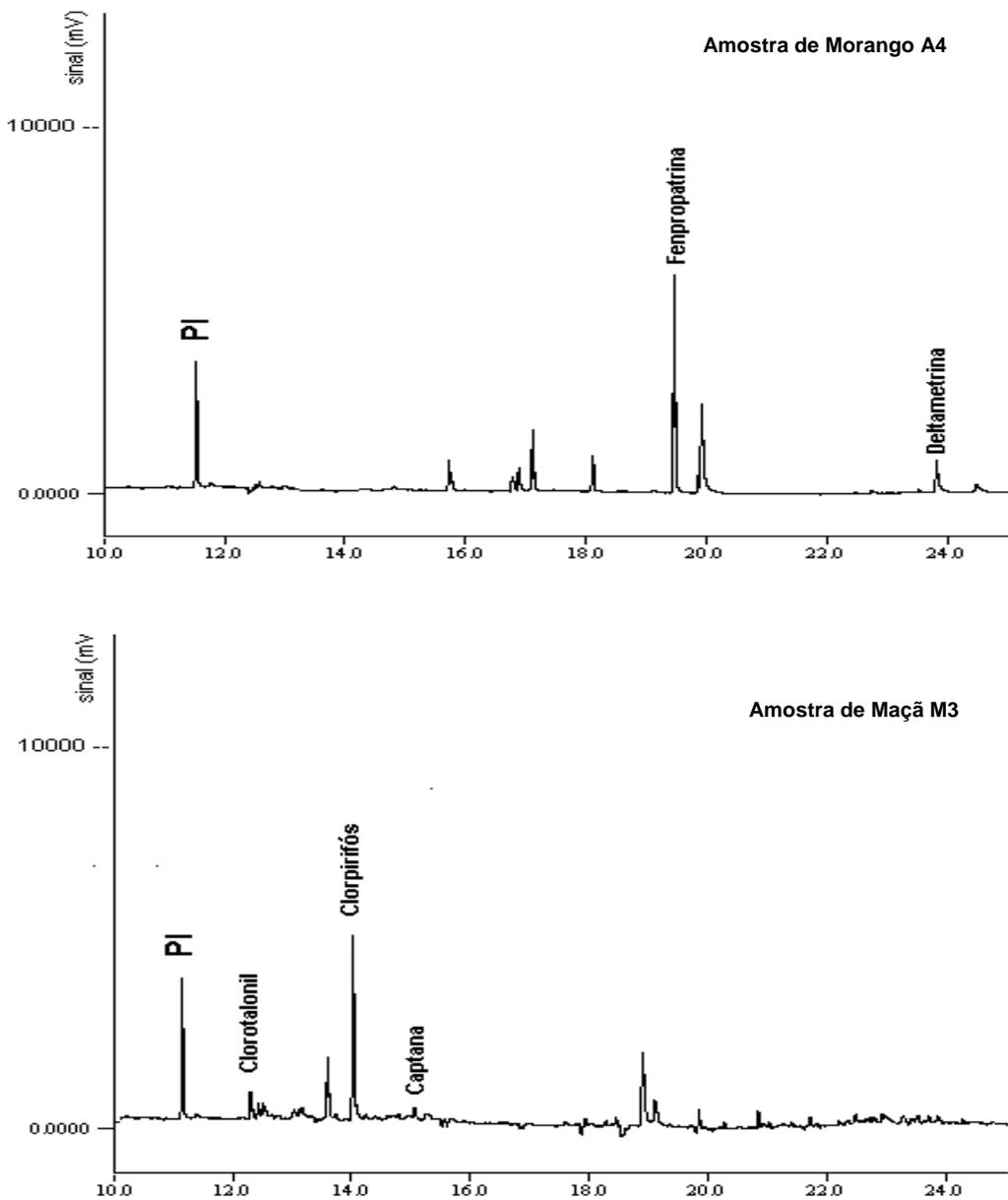
Pesticida	Nível de fortific. ($mg\ kg^{-1}$)	Morango			Maçã			Uva		
		R%	RSD_{rp} (%)	RSD_{pip} (%)	R%	RSD_{rp} (%)	RSD_{pip} (%)	R%	RSD_{rp} (%)	RSD_{pip} (%)
Clorotalonil	0,012	98,1	1,6	3,8	92,6	2,1	10,2	98,5	5,7	10,2
	0,062	90,2	3,0	3,0	101,3	3,7	0,6	95,5	1,7	5,0
	0,625	96,8	5,0	3,3	97,7	5,2	2,1	101,6	3,8	1,5
Clorpirifós	0,012	87,7	2,2	5,6	87,5	2,3	5,7	85,4	2,9	4,5
	0,062	90,6	3,7	0,5	96,1	2,5	5,2	104,2	3,1	8,0
	0,625	106,1	3,2	1,1	83,3	2,2	3,4	102,6	2,2	9,3
Captana	0,012	98,4	1,5	0,1	101,4	4,8	6,7	70,1	1,3	9,4
	0,062	85,5	3,3	4,3	100,4	1,3	10,2	96,0	1,1	9,3
	0,625	92,5	1,2	5,0	97,5	1,3	2,4	99,5	4,5	3,4
Procimidona	0,012	86,0	0,8	2,9	99,9	0,5	1,8	95,1	5,8	5,5
	0,062	98,2	3,0	7,1	106,0	4,2	14,5	103,3	3,2	3,5
	0,625	92,8	4,3	7,0	95,4	0,6	0,4	108,9	1,5	12,3
Cresoxim metílico	0,012	88,5	4,7	5,4	96,4	1,4	6,8	100,0	2,0	8,4
	0,062	89,3	4,4	10,8	107,5	2,3	13,3	103,7	2,0	2,4
	0,625	88,9	4,2	8,2	90,1	0,6	2,9	106,0	1,7	2,5
Iprodiona	0,031	88,1	5,0	4,8	99,6	2,7	0,9	99,8	4,1	9,5
	0,156	92,0	3,3	6,3	101,5	1,2	10,6	101,1	4,7	0,5
	1,562	95,7	0,3	8,3	86,7	2,6	4,9	101,9	1,0	0,8
Fenpropatrina	0,012	95,6	4,3	0,7	93,8	4,9	3,6	90,2	3,0	0,2
	0,062	92,1	4,5	5,1	99,7	3,1	1,5	97,6	2,5	1,4
	0,625	91,5	1,5	1,7	95,8	1,5	11,8	104,6	0,6	1,5
Deltametrina	0,001	96,6	0,6	10,1	100,2	5,0	5,0	103,8	1,0	5,3
	0,006	103,9	5,6	9,0	95,7	3,2	8,3	98,6	1,8	5,2
	0,062	103,2	2,5	4,2	101,6	4,8	7,9	97,3	4,4	3,1
Azoxistrobina	0,031	95,6	2,0	6,0	100,3	2,0	14,8	99,5	3,5	4,5
	0,156	92,9	2,4	5,3	104,4	4,1	3,0	103,6	1,6	4,0
	1,562	95,7	1,4	4,7	102,1	0,9	1,5	111,3	2,6	5,5

(3 extrações e 3 injeções cada)

4.9. Aplicação do procedimento desenvolvido

O procedimento desenvolvido foi aplicado nas 21 amostras adquiridas em diferentes pontos no comércio local, como descrito no item 3.10, e analisadas conforme citado nos itens 3.16 e 3.16.1.

As Tabelas 26, 27 e 28 apresentam os valores de concentração para os pesticidas investigados em amostras de morango, maçã e uva, respectivamente e a Figura 7 demonstra alguns cromatogramas obtidos na análise das amostras.



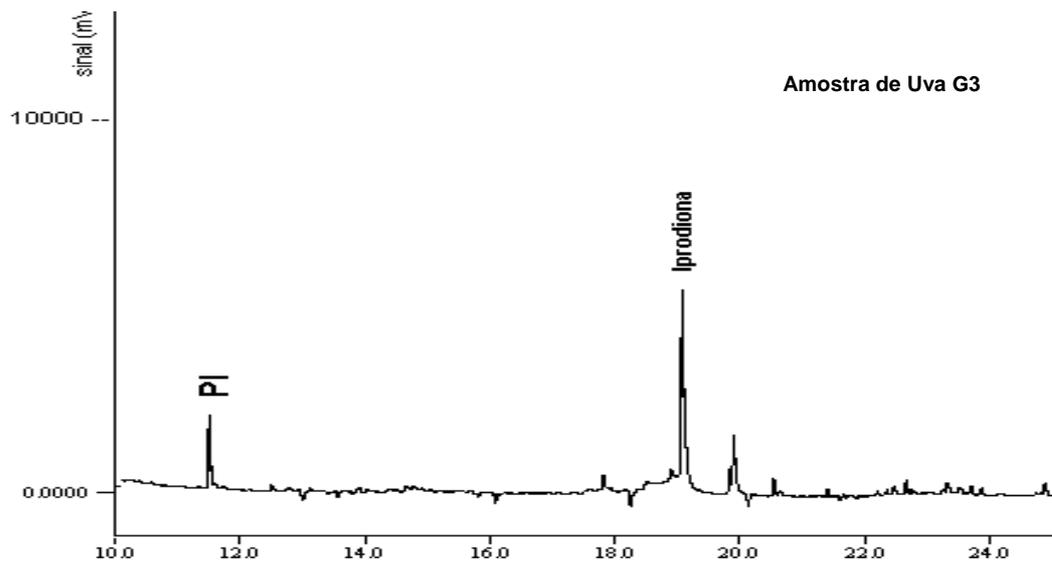


Figura 7. Cromatogramas obtidos a partir das amostra de morango (A4), maçã (M3) e uva (G3).

Tabela 26. Concentrações dos compostos estudados encontrados em amostras de morango

Amostras	Clorotalonil	Clorpirifós	Captana	Procimidona	Cresoxim metílico	Iprodiona	Fenpropatrina	Deltametrina	Azoxistrobina
	Concentração no extrato final (mg L ⁻¹)								
A1	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
A2	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A3	n.d.	0,042	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
A4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,523	0,415	n.d.
A5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,146	<LOQ	n.d.	n.d.
A6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,026
A10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,043	n.d.	n.d.	n.d.
A12	n.d.	0,023	n.d.	n.d.	n.d.	0,049	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.= não detectado
(2 extrações e 3 injeções cada)

Tabela 27. Concentrações dos princípios ativos estudados em amostras de maçã

Amostras	Clorotalonil	Clorpirifós	Captana	Procimidona	Cresoxim metílico	Iprodiona	Fenpropratrina	Deltametrina	Azoxistrobina
	Concentração no extrato final (mg L ⁻¹)								
M1	<LOQ	0,120	<LOQ	n.d.	n.d.	0,089	n.d.	<LOQ	n.d.
M3	0,010	0,109	0,012	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.
M4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
M5	<LOQ	n.d.	0,051	n.d.	n.d.	0,101	n.d.	n.d.	n.d.
M6	n.d.	n.d.	0,011	n.d.	n.d.	0,159	<LOQ	<LOQ	n.d.

n.d.= não detectado
(2 extrações e 3 injeções cada)

Tabela 28. Concentração dos pesticidas em estudo, encontrados em amostras de uva

Amostras	Clorotalonil	Clorpirifós	Captana	Procimidona	Cresoxim metílico	Iprodiona	Fenpropratrina	Deltametrina	Azoxistrobina
	Concentração no extrato final (mg L ⁻¹)								
G1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,069	n.d.	n.d.	n.d.
G2	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
G3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,141	n.d.	n.d.	n.d.
G4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
G5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,739	n.d.	n.d.	>LOQ

n.d.= não detectado
(2 extrações e 3 injeções cada)

Na aplicação do procedimento desenvolvido constatou-se que, dentre as amostras de morango adquiridas, quatro apresentaram contaminação com pesticidas que não são permitidos pela Legislação Brasileira (ANVISA) para esta cultura (A1, A2, A3 com resíduos de captana abaixo do LOQ do procedimento, A1 e A3 com resíduos de deltametrina e A3 e A12 contaminadas com clorpirifós). Já as demais amostras desta cultura apresentaram resíduos dentro dos LMR permitidos em lei, sendo que em três amostras, A6, A7 e A8, não foram detectado nenhum dos pesticida alvo deste estudo, onde cabe se destacar que a amostra A8 é oriunda de feira de produtos agroecológicos.

Nas análises realizadas com maçã foi detectada a presença, em duas amostras (M1 e M3), do pesticida clorpirifós, excluído da relação de pesticidas recomendada pela produção integrada de maçãs (ABMP, 2005) para a safra atual (2004/2005) e de uso proibido pela Legislação Federal vigente (ANVISA). Dentre as demais, constatou-se a presença de resíduos, dentro dos LMR permitidos, dos pesticidas em estudo, exceto em uma amostra (M4) em que não foram detectados resíduos dos pesticidas alvo. A amostra M6, de maçã importada, apresentou resíduos dentro dos limites estipulados no Brasil (ANVISA).

Já para as amostras em acondicionamento diferenciado, com apelo ao público infantil, foram detectados resíduos de clorotalonil ($0,006 \text{ mg kg}^{-1}$), clorpirifós ($0,068 \text{ mg kg}^{-1}$), captana ($0,007 \text{ mg kg}^{-1}$) e iprodiona ($<\text{LOQ}$) em M3 e de clorotalonil ($<\text{LOQ}$), captana ($0,032 \text{ mg kg}^{-1}$) e iprodiona ($0,063 \text{ mg kg}^{-1}$) em M5, sendo que em ambas foram detectados resíduos de produtos não permitidos para essas culturas (clorotalonil e clorpirifós). A não obediência dos LMRs para esse tipo de amostras é preocupante pois crianças são mais sensíveis à contaminação, possuindo valores de IDA muito inferiores devido ao seu baixo peso corporal (CALDAS & SOUZA, 2000).

Já nas amostras analisadas de uva, uma apresentou resíduos de pesticidas não permitidos para sua cultura (clorpirifós em G2, com concentração abaixo do LOQ), enquanto que as demais se mantiveram dentro dos limites permitidos atualmente, com resíduos de iprodiona em G1, G3 e G5 e azoxistrobina em valores abaixo do LOQ do procedimento em G5.

Em relação aos limites internacionais, algumas amostras de morango apresentaram contaminação acima dos LMRs permitidos, tais como a amostra A4 com resíduos de deltametrina ($0,289 \text{ mg kg}^{-1}$) quase 6 vezes acima dos limites permitidos pelo *Codex Alimentarius* e pela UE e fenpropatrina ($0,327 \text{ mg kg}^{-1}$) com

uso não autorizado para esta cultura, e as amostras A3 e A12 que apresentaram resíduos de clorpirifós (0,026 e 0,014 mg kg⁻¹, respectivamente), pesticida não autorizado pelo *Codex Alimentarius* nesta cultura.

Já nas amostras de maçã analisadas foram encontrados resíduos de clorotalonil, não registrado para essa cultura pelo *Codex Alimentarius* nem pela UE, em M1 (<LOQ), M3 e M5, e o pesticida iprodiona em M1 (0,056 mg kg⁻¹), M3, M5 e M6 (0,099 mg kg⁻¹), não listado pelo *Codex Alimentarius* para esta cultura mas autorizados pela UE (10,0 mg kg⁻¹).

As amostras de uva, por sua vez, apresentaram poucos resíduos dos pesticidas estudados, todos dentro dos LMRs citados pelo *Codex Alimentarius* e UE, exceto pela amostra G5 com resíduos de azoxistrobina (<LOQ), pesticida ainda não autorizados pelo *Codex Alimentarius* para esta cultura.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que o procedimento analítico proposto para determinação simultânea dos nove pesticidas selecionados (azoxistrobina, captana, clorpirifós, clorotalonil, cresoxim metílico, deltametrina, fenpropatrina e procimidona) em amostras de morango, maçã e uva, empregando GC-ECD, mostrou-se eficiente, rápido, preciso e exato.

A otimização dos métodos de extração, purificação e concentração, aliados a alta sensibilidade e seletividade inerentes ao detector utilizado, permitiram a quantificação dos compostos de interesse em concentrações bastante baixas, em relação aos níveis relatados na literatura. Da mesma forma, as condições cromatográficas adotadas permitiram a obtenção de bons resultados de resolução e separação entre os compostos em estudo.

Na etapa de validação do procedimento proposto, podem-se avaliar os principais parâmetros nos ensaios efetuados com os pesticidas, preparados em solvente e no extrato das matrizes. Assim, os parâmetros avaliados foram considerados satisfatórios, de acordo com os valores sugeridos na literatura para análise de resíduos de pesticidas por métodos cromatográficos. Salienta-se, também, o envolvimento necessário ao processo de validação do procedimento, que pode ser observado na relação de dados obtidos, proporcionais à qualidade deste na obtenção dos resultados.

Apesar da necessidade de uma etapa de purificação do extrato das matrizes, para alcançar os limites apresentados, esta se mostrou eficiente, fornecendo recuperações satisfatórias na faixa de concentração trabalhada.

Uma das vantagens do procedimento adotado situa-se na redução na quantidade de solventes comumente utilizados nos demais procedimentos citados na literatura, tornando-o mais barato e menos moroso. Além do mais, os solventes utilizados na extração são menos tóxicos comparados aos empregados tradicionalmente, o que condiz com os princípios da Química Verde (SILVA *et al.*, 2005).

Avaliando-se os resultados obtidos na aplicação do procedimento, a análise das amostras adquiridas no comércio santamariense constatou a presença, em alguns casos, de resíduos de pesticidas não permitidos pela Legislação Brasileira

(ANVISA) vigente para determinada cultura, como é o caso de clorpirifós. Pesticida altamente tóxico e de uso restrito a culturas de algodão, batata, café, cevada, frutas cítricas, milho, pastagens, soja, sorgo e trigo, o clorpirifós esteve presente em 5 das 21 amostras analisadas, o que demonstra a não obediência, por parte de determinados produtores, das boas práticas agrícolas.

De modo geral, os índices de contaminação foram altos para as amostras investigadas, onde das 21 amostras analisadas, 16 apresentaram resíduos de pesticidas, sendo 8 destas amostras de morango, 4 de maçã e 4 de uva. Entretanto, a maioria das amostras apresentaram concentrações abaixo dos LMRs estabelecidos nacionalmente. sendo que 8 destas estavam contaminadas com pesticidas não permitidos para suas respectivas culturas. Comparando-se com os limites internacionais citados neste trabalho, 3 das amostras de morango, 4 de maçã e 1 de uva apresentaram contaminação com resíduos dos pesticidas estudados, não autorizados para suas culturas.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Ampliar a gama de pesticidas analisados nas matrizes estudadas;
- Desenvolver procedimento semelhante para a determinação de pesticidas em sucos e concentrados comerciais;
- Desenvolver procedimento semelhante para a determinação de pesticidas em comida de bebê industrializadas a base de frutas;
- Avaliar o procedimento proposto em diferentes matrizes de frutas tais como pêsego/nectarina, ameixa, nêspera, framboesa, figo, goiaba, banana, mamão e frutas cítricas em geral;
- Aplicação do procedimento na realização de estudos de degradação de pesticidas em morangos cultivados em estufas.

7. REFERÊNCIAS

AGUERA, A., CONTRERAS, M., CRESPO, J., FÉRNANDEZ-ALBA, A., **Analyst**, 127 (2002) 347-354.

AGUERA, A., LÓPEZ, S., CONTRERAS, M., CRESPO, J., FÉRNANDEZ-ALBA, A., PIEDRA, L., **J. Chromatogr. A**, 1045 (2004) 125-135.

AGRORGÂNICA. In: Produção de alimentos orgânicos. Disponível em: <www.agrorganica.com.br> Último acesso em: 26 out. 2004.

ALBERO, B., SÁNCHEZ-BRUNETE, C., DONOSO, A., TADEO, J., **J. Chromatogr. A**, 1043 (2004) 127-133.

ALBERO, B., SANCHEZ-BRUNETE, C., TADEO, J., **Talanta** (2005) *In Press*

ANDRIGUETO, A. In: Começa a rastreabilidade das frutas. Disponível em <<http://www.revistaagroamazonia.com.br/9-entrevista-02.htm>>. Último acesso em 10 jul. 2004.

ANVISA. In: SIA- Sistema de Informação sobre Agrotóxicos. Disponível em <http://www4.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm_dados_ingrediente.asp>. Último acesso em 20 jan. 2005.

ARAÚJO, A., AUGUSTO, L., TELLES, D., **Rev. Bras. Toxicologia**, 1 (2000) 25-26.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODURES DE MAÇÃ (ABPM). In: Instrução técnica CTP/M ciclo 2004-05. Disponível em <<http://www.abpm.org.br>>. Último acesso em 21 jan. 2005.

BARRETO, H., INOMATA, O., LEMES, N., KUSSUMI, T., *et al.*, **Pesticidas** : **Revista Técnico Científica**, 6 (1996) 1-3.

BERBARI, S. A. G., NOGUEIRA, J. N. , CAMPOS, S. D. S., **Ciênc. Tecnol. Alimentos.**, 18 (1) (1998), 82-86.

BIBLIOTECA VIRTUAL DO ESTUDANTE BRASILEIRO, In: Morango. Disponível em <<http://www.bibvirt.futuro.usp.br/especiais/frutasnobrasil/morango.html>>. Último acesso em 10 ago. 2004.

BIBLIOTECA VIRTUAL DO ESTUDANTE BRASILEIRO, In: Uva. Disponível em <<http://www.bibvirt.futuro.usp.br/especiais/frutasnobrasil/uva.html>>. Último acesso em 10 ago. 2004.

BLASCO, C., PICÓ, Y., MAÑES J., FONT, G., **J. Chromatogr. A**, 947 (2002) 227-235.

BONNECARRÈRE, R. **Soluções nutritivas e formas de manejo do morangueiro em hidroponia**. Dissertação de Mestrado, UFSM, Santa Maria, RS, 2000, 56f.

BRASIL, Ministério da Agricultura do Abastecimento. **Legislação Federal de Agrotóxicos e Afins**, 1998, p. 173-177.

BRASIL. **Resolução nº 165**, de 29 de agosto de 2003. Determina a publicação do "Índice das monografias dos ingredientes ativos de agrotóxicos, domissanitários e preservantes de madeira", cujo emprego encontra-se autorizado conforme descrito na monografia. ANVISA, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 set. 2003.

BUHR, A., GENNING, G., SALTHAMMER, T. **Fresenius J. Anal. Chem.**, 367 (2000) 73-78.

BULDINI, P., RICCI, L., SHARMA, J., **J. Chromatogr. A**, 975 (2002), 47-70.

CAIRNS, T., SHERMA, J.,(Ed). **Emerging Strategies for Pesticide Analysis**. Série Modern Methods for Pesticide Analysis, Flórida, EUA, 351 p., 1996.

CALDAS, E., SOUZA, L., **Rev. Saúde Pública**, 34 (5) (2000) 529-537.

CHRISTENSEN, H., GRANBY, K., **Food Addit. Contam.**, 10(18) (2001) 874-886.

CHU, X., HU, X., YAO, H., **J. Chromatogr. A**, 1063 (2005) 201–210.

CLIFTON, E. M. In MELOAN, C. E., (Ed). **Pesticides Laboratory Training Manual**, AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA, 484 p., 1996.

CODEX ALIMENTARIUS. Disponível em < <http://www.codexalimentarius.net>>. Último acesso em 14 fev. 2005.

CODEX. In: CODEX ALIMENTARIUS. In: Pesticide Residues in Food. Disponível em <<http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=FoodQuality>>. Última atualização em 02/09/1999. Último acesso em 30 mar. 2004.

COLUMÉ, A., CÁRDENAS, S., GALLEGRO, M., VALCÁRCEL, M., **Anal. Chim. Acta**, 436 (2001) 153-162.

COLUMÉ, A., CÁRDENAS, S., GALLEGRO, M., VALCÁRCEL, M., **J. Chromatogr. A**, 882 (2000) 193-203.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S., **Introdução a Métodos Cromatográficos**, 6ª ed., Campinas: Editora da Unicamp, 1995, 279 p.

COMISSÃO EUROPEIA. In: Pesticides and Contaminants. Diretiva do conselho 90/642/EEC. Disponível em <[http:// europa.eu.int/comm./food/plant/protection/ resources/mrl_pesticide.pdf](http://europa.eu.int/comm./food/plant/protection/resources/mrl_pesticide.pdf)> Último acesso em: 21 jan. 2005.

CURTI, F., **Efeito da maçã gala (*Malus domestica* Bork) na lipidemia de ratos hepercolesterolêmicos**. Dissertação de Mestrado, USP, Piracicaba, SP, 2003, 90f.

CHASIN, A. A., NASCIMENTO, E. S., RIBEIRO-NETO, L. M., *et al.*, **Rev. Bras. Toxicol.**, 11 (1998) 1-6.

DALSENTER, P., In: Efeitos do Piretróide Deltametrina sobre o Sistema Reprodutivo de Ratos Machos Púberes e Adultos Expostos In Útero e Durante a Lactação. Disponível em <http://farmacologia.bio.ufpr.br/posgraduacao/resumo_dissertacoes.htm>. Último acesso em 30 nov. 2004.

EMBRAPA. In: Produção Integrada de Maçãs no Brasil. Disponível em <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/maca/>>. Último acesso em 27 jan. 2005.

EMBRAPA. In: Embrapa apresenta técnicas de produção de frutas de alta qualidade. Disponível em <http://www21.sede.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/2004/setembro/bn.2004-11-25.3880624504/mostra_noticia> Divulgada em 03 set. 2004. Último acesso em 02 fev. 2005.

FRENICH, A., VIDAL, J., LÓPEZ, T., AGUADO, S., *et al.*, **J. Chromatogr. A**, 1048 (2004) 199-206.

GARCIA, G., **VEJA**, 1852 (37) (2004) p. 169.

GARP, Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas, **Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos**, 1999.

GAZETA MERCANTIL. In: produção integrada dá acesso ao mercado externo. Disponível em <http://www.codevasf.gov.br/noticiasCODEVASF/20041022_01> Publicada em 20 out. 2004. Último acesso em 20 jan. 2005.

GENERAL INPECTORATE FOR HEALTH PROTECTION. **Analytical Method for Pesticide Residues in Foodstuffs**. Holanda, 6^a ed., 1996, p. 1-22.

GELSOMINO, A., PETROVICOVÁ, B., TIBURTINI, S., MAGNANI, E., *et al.*, **J. Chromatogr. A**, 782 (1997) 105-122.

GIZA, I., SZTWIERTNIA, U., **Act. Chromatographica**, 13 (2003) 226-229.

HAJSLOVÁ, J., ZROSTLÍKOVA, J., **J. Chromatogr. A**, 1000 (2003) 181-197.

HERCEGOVÁ, A., DÖMÖTÖROVÁ, M., MATISOVÁ, E., KIRCHNER, M., *et al.*, **J. Chromatogr. A**, (2004) *In Press*.

HOFF, G., ZONEN, P., **J. Chromatogr. A**, 843 (1999) 301-322.

INMETRO. **Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**. Revisão 01. DOQ-CGCRE-008. março 2003.

JIMÉNEZ, J., BERNAL, J., NOZAL, M., TORIBIO, L., *et al.*, **J. Chromatogr. A**, 919 (2001) 147-156.

JORNAL VIDA INTEGRAL, In: **Hortaliças & Frutas**. Disponível em: <<http://www.vidaintegral.com.br/nutricao/organicos1.php>>. Último acesso em 20 jan 2005.

KURZ, M. **Validação de metodologia empregando GC-ECD para o estudo de degradação do fungicida clorotalonil em tomate e pepino cultivados em estufa**. Dissertação de Mestrado, UFSM, Santa Maria, RS, 2002, 88f.

LACASSIE, E., DREUFUSS, M., VIGNAUD, M., MARQUET, P., *et al.*, **J. Chromatogr. A**, 805 (1998) 319-326.

LAMBROPOULOU, D., ALBANIS, T., **J. Chromatogr. A**, 993 (2003) 197-203.

LANÇAS, F. M., **Cromatografia em Fase Gasosa**, São Paulo: Ed. Acta, 1993, 254 p.

LANÇAS, F., **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**, São Carlos, Ed. RiMa, 2004, 62p.

LARINI, L., **Toxicologia dos Praguicidas**, São Paulo: Ed. Manole, 1999, 230 p.

LUKE, M.A., FROBERG, J.E., MASUMOTO, H.T. **J. Ass. Oficial Anal. Chem.**, 58(5) (1975) 1020-1026.

MARONEZE, A. **Validação de procedimento analítico empregando SPE e GC-ECD para determinação de pesticidas organoclorados em água e avaliação da permeabilidade destes nos dialisadores utilizados em hemodiálise**. Dissertação de Mestrado, UFSM, Santa Maria, RS, 2004.

MASTOVSKÁ, K., LEHOTAY, S., **J. Chromatogr. A**, 1040 (2004) 259–272.

MATTERN, G., LIU, C., LOUIS, J., ROSEN, J., **J. Chromatogr. A**, 39 (1991) 700-704.

MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL. In: Uva Rústica. Disponível em <<http://www.irrigar.org.br/pademb/print.php?fr=uvr&num=1>> Último acesso em 01 nov. 2004.

MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL. In: **Fruticultura bate recorde de exportações em 2004**. Disponível em <http://www.irrigar.org.br/noticias/noticia1_janeiro12005.php>. Último acesso em 31 jan. 2005.

MISTURA, C. M., **Validação de metodologia para determinação de resíduos de pesticidas organoclorados em sedimentos do lago da barragem do capingüí, RS, empregando GC-ECD e GC-MS**. Dissertação de Mestrado, UFSM, Santa Maria, RS, 2003, 208f.

MOL, H., DAM, R., STEILER, O. **J. Chromatogr. A**, 1015 (2003) 119–127.

MORANGUITOS, In:Histórico. Disponível em <<http://geocities.yahoo.com.br/rhannyadesigner/historico.html>>. Último acesso em 17 fev. 2004.

NAVALÓN, A., PRIETO, A., ARAUJO, L., VÍLCHEZ, J., **J. Chromatogr. A**, 975 (2002) 355-360.

NAVARRO, M., PICÓ, Y., MARÍN, R., MAÑES, J., **J. Chromatogr. A**, 968 (2002) 201-209.

OPPERMANN, A., **Superinteressante**, 206 (2004) 56-60.

ORTELI, D., EDDER, P., CORVI, C. **Anal. Chim. Acta**. 320 (2004) 33-45.

PANG, G., CAN, Y., FAN, C., ZHANG, J., *et al.*, **J. Chromatogr. A**, 882 (2000) 231-238.

PESTICIDAS Y PLAGUICIDAS. Disponível em < <http://www.canal-h.net/webs/sgonzalez002/Toxico/PESTICIDAS.htm>>. Último acesso em 15 fev. 2005.

PIMENTEL, M. F.; BARROS NETO, B. **Quím. Nova** 19 (1996) 268-277.

PINTO, G. M. **Determinação de resíduos de herbicidas em águas utilizando extração em fase sólida seguida de separação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. Dissertação de Mestrado, UNICAMP, Campinas, SP, 1999, 93f.

PRIMEL, E. G., **Aplicação de extração em fase sólida e técnicas cromatográficas para a determinação de herbicidas em águas de superfície e acompanhamento da degradação a campo e no laboratório**, 170 f. Tese de Doutorado, UFSM, Santa Maria, RS, 2003.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H. et al., Validação em métodos Cromatográficos e Eletroforéticos, **Quím. Nova**, 27 (5) (2004) 771-780.

RIBEIRO, M., NAVICKIENE, S., POLESE, L., MINELLI, E. **Chromatographia**, 49 (1999) 212-214.

SAFI, J., ABOU-FOUL, N., EL-NAHHAL, Y., EL-SEBAE, A., **Nahrung Food**, 46(1) (2002) 34-39.

SANNINO, A., BOLZONI, L., BANDINI, M., **J. Chromatogr. A**, 1036 (2004) 161-169.

SANNINO, A., BOLZONI, L., BANDINI, M., **J. AOAC Int.**, 82 (5) (1999) 1229-1238.

SANNINO, A., BOLZONI, L., BANDINI, M., **J. AOAC Int.**, 86 (1) (2003) 101-108.

SANUSI, A., GUILLET, V., MONTURY, M., **J. Chromatogr. A**, 1046 (2004) 35-40.

SAQUET, A., **Efeito das temperaturas e concentrações de CO₂ e O₂ sobre a qualidade da maçã cultivar gala durante o armazenamento em amostra controlada**. Dissertação de Mestrado, UFSM, Santa Maria, RS, 1997, 105f.

SILVA, F., LACERDA, P., JONES JR., J. **Quim. Nova**, 28(1) (2005) 103-110.

SINDICATO RURAL DE JUNDIAÍ. In: Fruticultura. Disponível em <<http://www.srjundiai.com.br>>. Último acesso em 15 dez. 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). In: Dicionário dos Alimentos. Disponível em <http://www.diabetes.org.br/dicionario_alimentos/dic_m.php>. Último acesso em 10 fev. 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE FRUTICULTURA (SBF). In: Informativo SBF. Disponível em <http://www.ufpel.tche.br/sbfruti/informativo_sbf/informativo_02_2004.pdf>. Último acesso em 22 jan. 2005.

STAJNBAHER, D., ZUPANCIC-KARALJ, L. **J. Chromatogr. A**, 1015 (2003) 185-192 p.

STENSVAND, A., CHRISTIANSEN, A., **J. Agric. Food Chem.**, 48 (2000) 917-920.

SUMITOMO CHEMICAL. In: Material Safety Data Sheet. Disponível em <http://www.pestgenie.com.au/msds/sumitomo/SUMISCLEX%20500_29104509.pdf> . Último acesso 15 fev. 2005.

TAYLOR, M., HUNTER, K., HUNTER, K., LINDSAY, D., *et al.*, **J. Chromatogr. A**, 982 (2002) 225-236.

TOMLIN, C., **The e-Pesticide Manual**, The British Crop Protection Council Versão eletrônica 2.0, 2000.

TOPUZ, S., ÖZHAN, G., ALPERTUNGA, B. **Food Control**, 16 (2005) 87-92 p.

UENO, E., OSHIMA, H., SAITO, I., MATSUMOTO, H., **J. AOAC Int.**, 87(4) (2004) 1003-1015.

VARIAN. **3800 GC Operator's Manual**. 03-914648-00: Ver. 3. p.47-68, 1998.

VIDAL, J., ARREBOLA, F., MATEU-SÁNCHEZ, M., **J. Chromatogr. A**, 956 (2002) 203-213.

ZAMBONIM, C., CILENTI, A., PALMISANO, F., **J. Chromatogr. A**, 967 (2002) 255-260.

ZANELLA, R., PRIMEL, E. G., GONÇALVES, F. F., *et al.*, **J. Chromatogr. A** 904 (2000) 257-262.

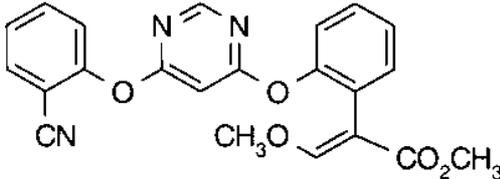
ZAVATTI, L., ABAKERLI, R., **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 34 (1999) 473-480.

WARE, W., **The Pesticide Book**, Califórnia, Thomson Publications, 1998, 5-7.

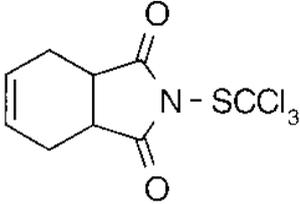
WHEI, M., JEN, J., **J. Chromatogr. A**, 1012 (2003) 111-118.

APÊNDICE A

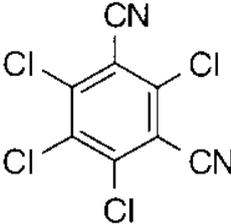
Dados inerentes aos princípios ativos em estudo, dispostos em ordem alfabética.

Nome Comum	AZOXISTROBINA
Fórmula	
Nome químico (IUPAC):	methyl (E)-2-{2-[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yloxy]phenyl}-3-methoxyacrylate
Nº CAS:	131860-33-8
Sinonímia:	ICIA 5504; E 5504; R 215504; Priori; Amistar; Pointer
IDA (mg kg ⁻¹ p.c.):	0,02
Log P (25 °C)	2,5
Classe / Modo de ação:	Fungicida / Sistêmico
Classificação toxicológica:	III - Medianamente tóxico
Fórmula molecular:	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅
Grupo químico:	Estrobilurina
Massa molecular (g mol ⁻¹):	403,4
Ponto de fusão (°C):	116
Solubilidade em água (a 25 °C):	6,0 µg L ⁻¹
Solubilidade em solventes orgânicos (a 20 °C):	Pouco solúvel em hexano e n-octanol, moderadamente solúvel em acetona, metanol e tolueno, altamente solúvel em acetato de etila, acetonitrila e diclorometano.
Nomes comerciais:	Amistar [®] (Zeneca), Olympus [®] (Zeneca), Priori [®] (Zeneca), Abound [®] (Zeneca).

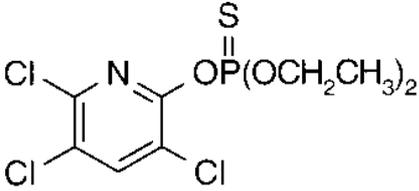
Fonte: ANVISA (2005) e TOMLIN (2000)

Nome Comum	CAPTANA
Fórmula	
Nome químico (IUPAC):	N-(trichloromethylthio)cyclohex-4-ene-1,2-dicarboximide
N° CAS:	133-06-2
Sinonímia:	SR406
IDA (mg kg ⁻¹ p.c.):	0,1
Log P (25 °C)	2,8
Classe / Modo de ação:	Fungicida / De contato
Classificação toxicológica:	IV - Pouco tóxico
Fórmula molecular:	C ₉ H ₈ Cl ₃ NO ₂ S
Grupo químico:	Dicarboximida
Massa molecular (g mol ⁻¹):	300,6
Ponto de fusão (°C):	178
Solubilidade em água (a 25 °C):	3,3 mg L ⁻¹
Solubilidade em solventes orgânicos (a 20 °C):	20 g L ⁻¹ em xileno, 70 g L ⁻¹ em clorofórmio, 21 g L ⁻¹ em acetona, 23 g L ⁻¹ em ciclohexanona, 6,9 g L ⁻¹ em tolueno, 2,9 g L ⁻¹ em etanol.
Nomes comerciais:	Captane [®] (Rallis), Sorene [®] (BASF), Criptan [®] (Vapco), Malvin [®] (Tomem), Orthocide [®] (Tomem), Sigma [®] (Tomem).

Fonte: ANVISA (2005) e TOMLIN (2000)

Nome Comum	CLOROTALONIL
Fórmula	
Nome químico (IUPAC):	tetrachloroisophthalonitrile
N° CAS:	1897-45-6
Sinonímia:	TCIN; m-TCPN; TPN; DS 2787
IDA (mg kg ⁻¹ p.c.):	0,03
Log P (25 °C)	2,92
Classe / Modo de ação:	Fungicida / De contato
Classificação toxicológica:	III - Medianamente tóxico
Fórmula molecular:	C ₈ Cl ₄ N ₂
Grupo químico:	isofthalonitrila
Massa molecular (g mol ⁻¹):	265,9
Ponto de fusão (°C):	252,1
Solubilidade em água (a 25 °C):	0,81 mg L ⁻¹
Solubilidade em solventes orgânicos (a 20 °C):	80 g L ⁻¹ em xileno e cicloexanona, 20 g L ⁻¹ em acetona e dimetilsulfóxido, <10 g L ⁻¹ em querosene.
Nomes comerciais:	Bravo [®] (Zeneca), Daconil [®] (Zeneca), Bravonil [®] (Syngenta), Tattoo C [®] (Bayer), Rover [®] (Simpcam).

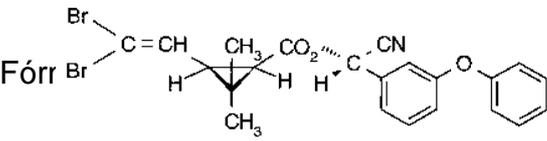
Fonte: ANVISA (2005) e TOMLIN (2000)

Nome Comum	CLORPIRIFÓS
Fórmula	
Nome químico (IUPAC):	O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate
N° CAS:	2921-88-2
Sinonímia:	Chlorpyriphos; Chlorpyrifos-ethyl
IDA (mg kg ⁻¹ p.c.):	0,01
Log P (25 °C)	4,7
Classe / Modo de ação:	Acaricida, Formicida e Inseticida / De contato e injeção
Classificação toxicológica:	II - Altamente tóxico
Fórmula molecular:	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Grupo químico:	organofosforado
Massa molecular (g mol ⁻¹):	350,6
Ponto de fusão (°C):	42 – 43,5
Solubilidade em água (a 25 °C):	1,4 mg L ⁻¹
Solubilidade em solventes orgânicos (a 20 °C):	5000 g L ⁻¹ em xileno, 6300 g L ⁻¹ em clorofórmio, 6500 g L ⁻¹ em acetona, 450 g L ⁻¹ em metanol.
Nomes comerciais:	Doser [®] (Dow AgroSciences), Lorsban [®] (Dow AgroSciences), Astro [®] (Bayer), Destroyer [®] (Agriphar), Condor [®] (CAS), Radar [®] (RPG).

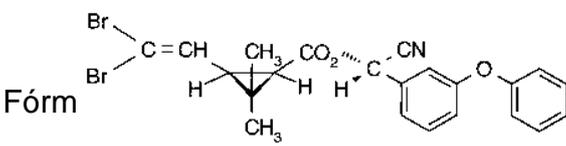
Fonte: ANVISA (2005) e TOMLIN (2000)

Nome Comum	CRESOXIM METÁLICO
Fórmul: 	
Nome químico (IUPAC):	methyl(E)-2-methoxyimino[2-(o-tolylloxymethyl)phenyl]acetate
N° CAS:	143390-89-0
Sinonímia:	strobilurin
IDA (mg kg ⁻¹ p.c.):	0,4
Log P (25 °C)	3,4 (pH 7)
Classe / Modo de ação:	Fungicida / De contato
Classificação toxicológica:	III - Medianamente tóxico
Fórmula molecular:	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄
Grupo químico:	Estrobilurina
Massa molecular (g mol ⁻¹):	313,4
Ponto de fusão (°C):	98 - 100
Solubilidade em água (a 25 °C):	2,0 mg L ⁻¹
Nomes comerciais:	Candit [®] (BASF), Stroby [®] (BASF), Kenbyo [®] (BASF), Sovran [®] (BASF), Discus [®] (BASF).

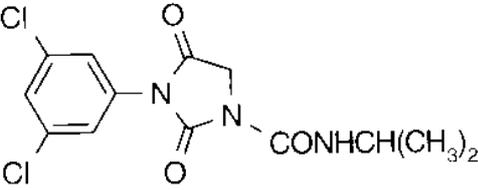
Fonte: ANVISA (2005) e TOMLIN (2000)

Nome Comum	DELTAMETRINA
	
Nome químico (IUPAC):	(S)-alpha-cyano-3-phenoxybenzyl (1R,3R)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate
N° CAS:	52918-63-5
Sinonímia:	NRDC 161; RU-22974
IDA (mg kg ⁻¹ p.c.):	0,01
Log P (25 °C)	4,6
Classe / Modo de ação:	Formicida e Inseticida / De contato e ingestão
Classificação toxicológica:	III - Medianamente tóxico
Fórmula molecular:	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃
Grupo químico:	Piretróide
Massa molecular (g mol ⁻¹):	505,2
Ponto de fusão (°C):	100 - 102
Solubilidade em água (a 25 °C):	<0,2 µg L ⁻¹
Solubilidade em solventes orgânicos (a 20 °C):	250 g L ⁻¹ em xileno, 450 g L ⁻¹ em benzeno, 500 g L ⁻¹ em acetona, 15 g L ⁻¹ em etanol.
Nomes comerciais:	Bitam [®] (Adventis), Cislin [®] (Adventis), Tess [®] (Adventis), Delete [®] (Vapco), Decis [®] 25 CE (Bayer), Terminator [®] (Vapco).

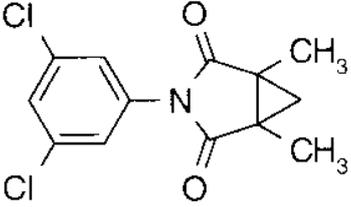
Fonte: ANVISA (2005) e TOMLIN (2000)

Nome Comum	FENPROPATRINA
Fórm 	
Nome químico (IUPAC):	(RS)-alpha-cyano-3-phenoxybenzyl 2,2,3,3-tetramethylcyclopropanecarboxylate
N° CAS:	39515-41-8
Sinonímia:	S-3206
IDA (mg kg ⁻¹ p.c.):	0,03
Log P (25 °C)	6,0
Classe / Modo de ação:	Acaricida e Inseticida / De contato
Classificação toxicológica:	II - Altamente tóxico
Fórmula molecular:	C ₂₂ H ₂₃ NO ₃
Grupo químico:	Piretróide
Massa molecular (g mol ⁻¹):	349,4
Ponto de fusão (°C):	45 - 50
Solubilidade em água (a 25 °C):	14,1 mg L ⁻¹
Solubilidade em solventes orgânicos (a 20 °C):	1000 g L ⁻¹ em xileno e ciclohexanona, 337 g L ⁻¹ em metanol.
Nomes comerciais:	Daminen [®] 300 CE (Sumitomo), Herald [®] (BASF), Meothrin [®] (Sumitomo), Digital [®] (Sanonda).

Fonte: ANVISA (2005) e TOMLIN (2000)

Nome Comum	IPRODIONA
Fórmula es: 	
Nome químico (IUPAC):	3-(3,5-dichlorophenyl)-n-isopropyl-2,4-dioximidazolidine-1-carboxamide
N° CAS:	36734-19-7
Sinonímia:	Glicofeno
IDA (mg kg ⁻¹ p.c.):	0,06
Log P (25 °C)	3,0 (pH3 e 5)
Classe / Modo de ação:	Fungicida / De contato
Classificação toxicológica:	IV – Pouco tóxico
Fórmula molecular:	C ₁₃ H ₁₃ Cl ₂ N ₃ O ₃
Grupo químico:	Dicarboximida
Massa molecular (g mol ⁻¹):	330,2
Ponto de fusão (°C):	134 °C
Solubilidade em água (a 25 °C):	13 mg L ⁻¹
Solubilidade em solventes orgânicos (a 20 °C):	10 g L ⁻¹ em n-octano, 168 g L ⁻¹ em acetonitrila, 150 g L ⁻¹ em tolueno, 255 g L ⁻¹ em acetato de etila, 450 g L ⁻¹ em diclorometano, 0,59 g L ⁻¹ em hexano.
Nomes comerciais:	Dirac [®] (Adventis), Diva [®] (Adventis), Amazzones [®] (Rocca), Rover [®] (Vapco), Viroval [®] (Vipesco).

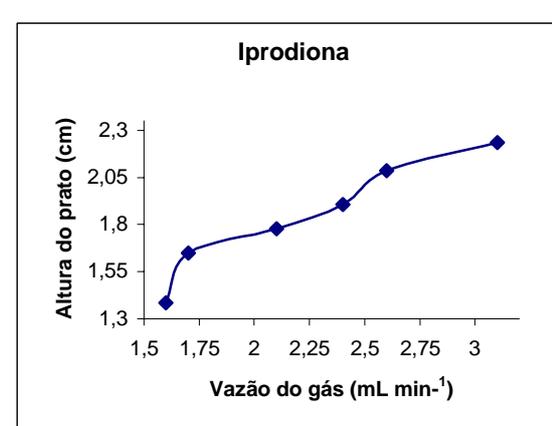
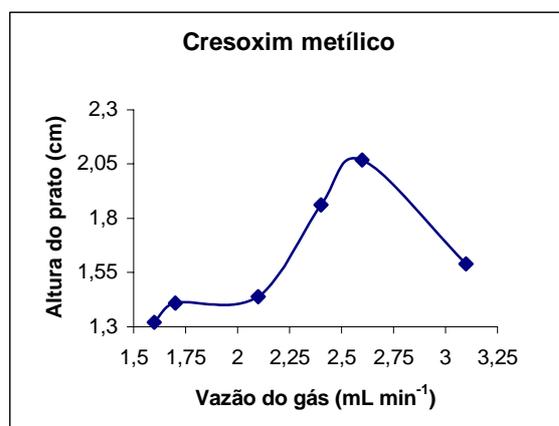
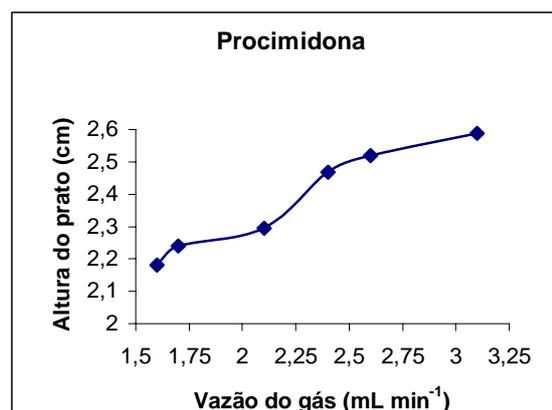
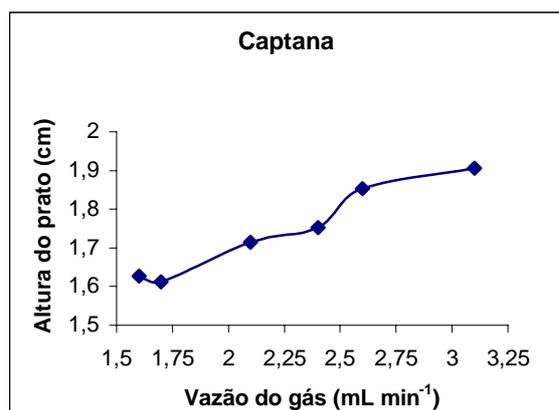
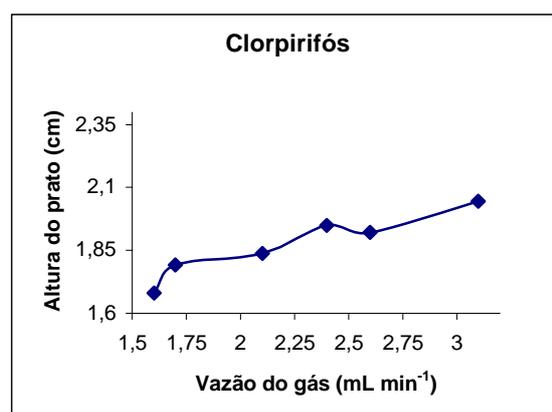
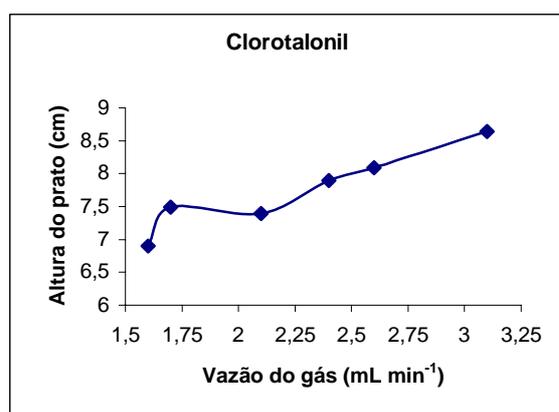
Fonte: ANVISA (2005) e TOMLIN (2000)

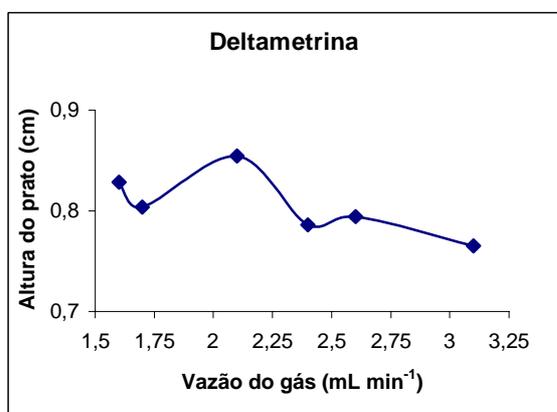
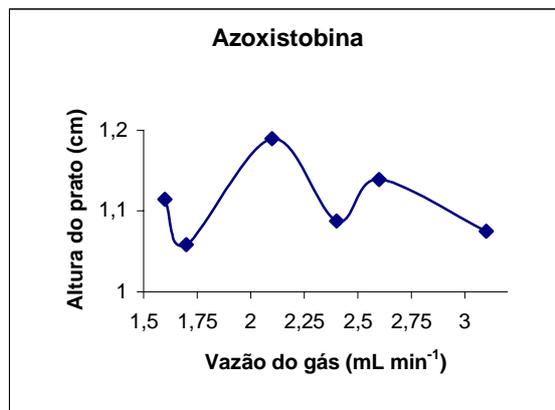
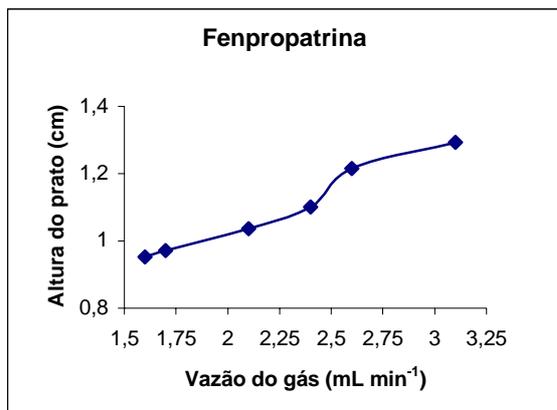
Nome Comum	PROCIMIDONA
Fórmula estru	
Nome químico (IUPAC):	N-(3,5-dichlorophenyl)-1,2-dimethylcyclopropane-1,2-dicarboximide
N° CAS:	32809-16-8
Sinonímia:	S-7131
IDA (mg kg ⁻¹ p.c.):	0,1
Classe / Modo de ação:	Fungicida / Sistemico
Classificação toxicológica:	IV - Pouco tóxico
Fórmula molecular:	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂
Grupo químico:	Dicarboximida
Massa molecular (g mol ⁻¹):	284,1
Ponto de fusão (°C):	166 – 166,5
Solubilidade em água (a 25 °C):	4,5 mg L ⁻¹
Solubilidade em solventes orgânicos (a 20 °C):	43 g L ⁻¹ em xileno, 210 g L ⁻¹ em clorofórmio, 180 g L ⁻¹ em acetona, 16,0 g L ⁻¹ em metanol.
Nomes comerciais:	Kimono [®] (Philagro), Prodone [®] (Agrochem), Proroc [®] (Rocca), Prolex [®] (Vapco), Progress [®] (AgroSan).

Fonte: ANVISA (2005) e TOMLIN (2000)

APÊNDICE B

Curvas de van Deemter, definidas no item 2.8.4, obtidas para os nove pesticidas em estudo estão abaixo demonstradas.





APÊNDICE C

Testes referentes a linearidade dos pontos pertencentes às curvas analíticas dos pesticidas em estudo, confeccionadas em acetato de etila, conforme citado no item 4.8.2.

Tabela 29. Dados referentes ao cálculo de linearidade para os pesticidas em estudo

Clorotalonil	$y_A = 42,878x - 0,3422$			$r^2_A = 0,9994$			$y_B = 42,878x - 0,3422$			$r^2_B = 0,9994$	
Concentração (mg L ⁻¹)	0,01	0,02	0,1	0,2	0,3*	0,3*	0,4	0,5	0,8	1,0	
Área média	0,109	0,552	3,699	8,316	12,542	17,317	21,669	37,728	46,753		
S/Q	101,2	104,1	94,2	101,0	100,2	101,4	100,1	97,7	101,5	99,4	
Clorpirifós	$y_A = 23,938x + 0,0154$			$r^2_A = 0,9996$			$y_B = 21,649x + 0,5294$			$r^2_B = 0,9986$	
Concentração (mg L ⁻¹)	0,01	0,02	0,1	0,2	0,3*	0,3*	0,4	0,5	0,8	1,0	
Área média	0,242	0,526	2,349	4,894	7,155	9,317	11,136	17,556	22,432		
S/Q	94,7	106,6	97,5	101,9	99,4	102,0	101,5	98,0	98,3	101,2	
Captana	$y_A = 26,842x - 0,1743$			$r^2_A = 0,9996$			$y_B = 23,752x + 0,8103$			$r^2_B = 0,9998$	
Concentração (mg L ⁻¹)	0,01	0,02	0,1	0,2	0,3*	0,3*	0,4	0,5	0,8	1,0	
Área média	0,143	0,386	2,395	5,217	7,898	10,202	12,844	19,876	24,487		
S/Q	114,3	102,5	95,5	100,4	100,3	99,5	98,9	101,3	100,3	99,7	

Procimidona	$y_A = 10,449 + 0,027$					$r^2_A=0,9984$		$y_B = 10,758x + 0,121$			$r^2_B=0,9989$
Concentração (mg L ⁻¹)	0,01	0,02	0,1	0,2	0,3*	0,3*	0,4	0,5	0,8	1,0	
Área média	0,131	0,238	1,063	2,083	3,157		4,073	5,621	8,631	10,548	
S/Q	100,9	101,1	99,1	98,4	99,8	101,6	97,5	100,1	101,7	99,2	
Cresoxim metílico	$y_A = 10,016 + 0,042$					$r^2_A=0,9993$		$y_B = 10,239x + 0,2526$			$r^2_B=0,9993$
Concentração (mg L ⁻¹)	0,01	0,02	0,1	0,2	0,3*	0,3*	0,4	0,5	0,8	1,0	
Área média	0,058	0,163	1,006	1,981	2,935		3,781	4,777	7,971	10,019	
S/Q	100,3	102,4	104,6	101,0	99,1	103,8	98,5	98,2	100,0	100,3	
Fenpropatrina	$y_A = 9,746 + 0,004$					$r^2_A=0,9996$		$y_B = 9,415x + 0,128$			$r^2_B=0,9989$
Concentração (mg L ⁻¹)	0,01	0,02	0,1	0,2	0,3*	0,3*	0,4	0,5	0,8	1,0	
Área média	0,089	0,223	0,952	1,980	2,918		3,993	4,727	7,55	9,492	
S/Q	95,2	116,3	98,1	101,8	100,0	98,8	102,6	97,7	101,3	99,5	
Iprodiona	$y_A = 35,439x - 0,1872$					$r^2_A=0,9995$		$y_B = 51,467x - 3,9448$			$r^2_B=0,998$
Concentração (mg L ⁻¹)	0,025	0,05	0,25	0,5	0,75*	0,75*	1,0	1,25	2,0	2,5	
Área média	0,140	0,552	3,428	6,750	10,520		17,317	22,248	37,469	47,123	
S/Q	92,3	104,3	102,0	97,9	100,7	93,7	103,3	101,8	100,6	99,2	

Deltametrina	$y_A = 16,62x + 0,085$					$r^2_A=0,997$		$y_B = 16,852x + 0,893$		$r^2_B=0,9990$	
Concentração (mg L ⁻¹)	0,001	0,002	0,01	0,02	0,03*	0,03*	0,04	0,05	0,08	0,1	
Área média	0,106	0,266	1,434	3,399	4,839	6,573	8,575	13,472	16,648		
S/Q	115,2	105,7	91,4	104,8	98,8	97,5	98,8	102,8	100,6	99,3	

Azoxistrobina	$y_A = 17,062x - 0,0107$					$r^2_A=0,9996$		$y_B = 21,532x - 1,4646$		$r^2_B=0,9996$	
Concentração (mg L ⁻¹)	0,025	0,05	0,25	0,5	0,75*	0,75*	1,0	1,25	2,0	2,5	
Área média	0,183	0,326	1,701	3,337	5,149	6,940	9,320	15,799	20,064		
S/Q	113,6	98,6	100,3	98,1	100,8	102,4	95,6	97,6	100,2	100,0	

* Ponto pertencente às duas curvas analíticas, A e B.

APÊNDICE D

Curvas analíticas obtidas em solvente e nos extratos das diferentes matrizes nas faixas de concentração A e B.

